INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Supplemento das Memorias

Nº. 10 31 de Agosto de 1929

## Summario:

**Fontes, Dr. A.** Saprophytismo do bacillo tuberculoso..... 205
**Lacorte, Dr. José Guilherme.** Molestia de HODGKIN..... 231
**Martins, Dr. Thales.** Pesquisas sobre a physiologia do lobo anterior da hypophyse e das glandulas sexuaes..... 233
**Aragão, Drs. H. de Beaurepaire e Costa Lima, A. da.** Sobre o poder infectante da hæmolympha de mosquitos contaminados com o virus da febre amarella..... 251

## Summary:

**Fontes, Dr. A.** Saprophitism of the tuberculous bacillus..... 218
**Lacorte, Dr. José Guilherme.** HODGKIN's disease..... 232
**Martins, Dr. Thales.** Researches on the physiology of the anterior hypophysis and sexual glands..... 242
**Aragão, Drs. H. de Beaurepaire and Costa Lima, A. da.** On the contamination of hæmolymph in mosquitoes infected by the yellow fever virus..... 253

O supplemento das Memorias destina-se á publicação immediata das pesquizas realizadas no Instituto Oswaldo Cruz.

RIO DE JANEIRO

Typ. do INSTITUTO OSWALDO CRUZ

1929

# SAPROPHYTISMO DO BACILLO TUBERCULOSO (1)

Pelo Dr. A. FONTES

Chefe de Serviço do Instituto Oswaldo Cruz

A noção de *saprophytismo* deve ser encarada sob diversos aspectos no estudo do bacillo de tuberculose: sob o aspecto classicamente admittido, noção microbiologica, sob o aspecto de avirulencia para o hospedeiro, noção pathogenica, sob o aspecto de reversibilidade de caracteres que permitta classificar o agente da infecção tuberculosa como originario de uma fonte unica, ponto de partida de typos apathogenos, symbioticos, ou virulentos, noção phylogenetica.

## I

*Existe o bacillo da tuberculose em vida saprophytica no meio exterior?*

A tendencia natural do espirito é crer que as especies actualmente pathogenicas ter-se-iam adaptado á vida parasitaria; umas incompletamente, podendo ainda exercer a funcção ordinaria e só vivendo como parasita occasionalmente; outras que, por se terem de tal sorte adaptado á vida parasitaria, perderam a faculdade de viverem nas condições do meio exterior, senão completamente, ao menos, quasi que por completo. Estas especies só em condições especiaes podem viver em condições de vida saprophytica, no sentido microbiologico, isto é, sujeitas ás vicissitudes do meio exterior.

O estudo da flora microbiana saprophytica revelou a existencia de uma classe de microorganismos, morphologicamente semelhantes ao bacillo de KOCH e como elle caracterisados pela estructura particular que lhes confere a propriedade de acido-resistencia.

Esta classe, conhecida ainda como a de germes para-tuberculosos, mostra representantes no solo, nos vegetaes, em productos animaes diversos; e se, acaso ficasse demonstrada a capacidade tuberculigena, de qualquer d'essas especies, não só o problema microbiologico como o medico e o hygienico, referentes á infecção tuberculosa, muito se esclareceria.

As verificações orientadas neste sentido por contraditorias ainda não fizeram praça.

As experiencias de KOLLE, SCHLOSSBERG e PFANNESTIEL (1) que inoculando bacillos saprophytas acido-resistentes e bacillos tuberculosos de animaes de sangue frio, conseguem em inoculação intra-peritoneal em cobayas, por passagens successivas, determinar a infecção tuberculosa generalisada, as de JOSEF IGERSHEIMER e H. SCHLOSSBERGER (2) que inoculando bacillos para-tuberculosos na camara anterior do olho em cobayas obtiveram lesões graves, semelhando ás produzidas por bacillos tuberculosos; ás de SAN FELICE (3) que conseguiu infecções tuberculosas ty-

(1) Memoria apresentada ao 2o. Congresso Pan-Americano de Tuberculose, reunido no Rio de Janeiro de 30 de Junho a 7 de Julho de 1929.

picas, partindo de um streptotryx acido-resistente, isolado de um rato, acham contradicta nas experiencias de BRUNO LANGE (4) com acido-resistente dos instrumentos de sopro, de BRUNO HEYMANN e WALTER STRAUSS (4) e de DAL COLLO (6).

MAHER (7) refere entretanto ter isolado de um abscesso traumatico do escroto um bacillo acido-resistente com os caracteres do bacillo de smegma que, por passagem em batata caldo glycerinado em estufa, ao cabo de 3 semanas originava pequenas colonias com aspecto de colonias do bacillo da tuberculose do typo humano.

Essas colonias deram por infecção da cobaya por via intra-peritonial o quadro de tuberculose generalisada, transmissivel em serie.

O caso clinico terminou 6 mezes depois por morte em virtude de tuberculose pulmonar, activa, inexistente clinicamente, por occasião de infecção do escroto.

CALMETTE (8) com BOQUET e NÉGRE não conseguiram mesmo depois de 10 passagens em cobayas e coelhos, augmento de virulencia de uma amostra de *phléole*, de MOELLER, nem tampouco a capacidade de determinar a formação de tuberculos; verificaram entretanto, que, após as passagens pelo organismo animal, a amostra em questão se cultivava mais facilmente á temperatura de 37oC. e que determinava o phenomeno de KOCH em cobayas tuberculosas, apezar de não exercer nenhum poder protector em relação ás inoculações subsequentes do bacillo tuberculoso.

Resulta entretanto ainda da observação de grande numero de observadores que a condição de pathogeneidade pode ser, ainda que accidentalmente, apresentada pelos acido-resistentes banaes, ou para-tuberculose. Assim concluem PHILIBERT, COURMONT, CANTACUZENE, BEZANÇON (9), e mesmo reacções biologicas tem sido evidenciadas que aproximam os para-tuberculose dos bacillos tuberculosos verdadeiros.

A para tuberculina de IRIMESCO (10), a funcção antigenica evidenciada por OGAWA (11), o estudo da biologia de differentes amostras (COURMONT, CANTACUZENE, DESCOS, RODET e GALAVIELLE (12) fallam sobre a possivel ligação de parentesco entre as bacterias acido-resistentes banaes e o bacillo de KOCH.

Se em verdade não poude ser ainda evidenciada nitidamente a funcção pathogena tuberculigena de acido-resistentes saprophytas, de sorte a permittir ligação phylogenetica clara entre elles e os bacillos da tuberculose, pode-se entretanto affirmar que: *condições especiaes podem agir sobre estes ultimos transformando-os em typos cada vez mais proximos ao dos acidos-resistentes banaes, por modificações profundas de sua biologia tornando-as avirulentas, alterando-lhes o bio-chinismo de sorte a perderem as principaes caracteristicas dos bacillos pathogenos, em estreita relação com a vida do parasitismo obrigatorio.*

As antigas verificações de AUCLAIR (13) fallam ainda em favor desta these.

Observações muito interessantes acabam de ser communicadas por LEON KARVACKI (14) á Sociedade Poloneza de Biologia. Possue KARVACKI dez amostras de bacillos tuberculosos que germinam e se desenvolvem em culturas á temperatura ordinaria. Quatro realisam o quadro saprophytico completo: facil desenvolvimento em meios communs, á tem-

peratura ordinaria, avirulencia por os animaes de laboratorio, funcção chromogena accentuada. Estas amostras de origem humana e de origem equina apresentam ainda profundas modificações do seu metabolismo cultural; alteração e enfraquecimento em algumas de poder fermentivo, cheiro pronunciado de trimethylamina, producção de tuberculina fraca. As outras 6 amostras apresentam ainda lacunas em seu saprophytismo.

Apezar de se desenvolverem a temperatura ordinaria, o seu desenvolvimento é lento e só se faz em meios proprios á tuberculose. Algumas dellas são já apathogenas para a cobaya.

As observações que desde 1923 venho fazendo nesta ordem de idéas fallam eloquentemente em favor do possivel saprophytismo do bacillo da tuberculose. Não me furto a transcrever o que com BARBOSA DA CUNHA (15) publiquei, para melhor entendimento das conclusões.

* * *

"Culturas de tuberculose aviaria, e bovina, antigas no laboratorio, com 5 mezes de desenvolvimento em gelose glycerinada á 5 o/o, foram transplantadas em 5-VII-23, para meios de SABOURAUD-maltosado e meio de SABOURAUD-maltosado-glycerinado á 5 o/o. As culturas se desenvolveram abundantemente nos tubos com o meio glycerinado e foram pouco abundantes nos tubos isemptos de glycerina. As amostras semeadas se comportaram igualmente, não sendo possivel estabelecer differença apreciavel no desenvolvimento das respectivas colonias, quando comparadas nos mesmos meios de cultura. (Observação feita em 11-XI-923).

N'esta ultima data se procedeu a uma nova passagem nos mesmos meios, tendo sido observado um mez depois culturas mais abundantes que da primeira passagem. Estas culturas foram conservadas até Abril de 1924, quando iniciamos a verificação por novas series utilisando-nos das amostras mais antigas da collecção do Instituto. Dentre estas sobreleva notar a amostra T. M. 1 (typo humano) que nessa occasião contava cerca de 25 annos de passagens successiva em meios artificiaes, sem passagem em animal e que conservava toda a virulencia e caracteres morphologicos e culturaes classicos.

Não só essa amostra como ainda outra do typo humano (T. M. 4) e outras do typo bovino foram mantidas por passagens successivas em meios de SABOURAUD-maltosado, glycerinado-glycosado-maltosado, glycerinado-glycosado, conservação, conservação-glycerinado e gelose-glycerinada, até Outubro de 1924, sem que fossem notadas differenças accentuadas no desenvolvimento das culturas, nem na virulencia das amostras.

Pelos exames repetidos essas amostras conservaram sempre sua morphologia em bastonetes mais ou menos granulosos, sua acido-resistencia mais ou menos accentuada e sua virulencia sem modificação apreciavel. O mesmo succedeu em culturas mantidas por passagens repetidas em meios liquidos de composição identica ao SABOURAUD (com exclusão de gelose) e no meio usado para o preparo da vaccina do carbunclo symptomatico, immensamente favoravel á attenuação desse germem, e que é constituido pelo caldo de carne, sôro de cavallo e glycose.

Ainda ahi as amostras de tuberculose semeiadas se desenvolveram sem attenuação apreciavel de sua virulencia e sem modificação sensivel na sua morphologia e caracteres culturaes. (Observações feitas em 8 de Setembro de 1924).

Alguns dos tubos de cultura em SABOURAUD-maltosado, glycerinado-maltosado e glycosade-maltosado foram deixados fóra da estufa em exposição á luz diffusa, arrolhados com rolha de cortiça, sem nenhuma repicagem. Assim de Agosto de 1924 a Novembro de 1926 permaneceram essas culturas, quando foram então repicadas para novos tubos de SABOURAUD. *A semente não se desenvolveu nos tubos repicados, que foram conservados na estufa durante 45 dias.*

Addicionou-se então um pouco de caldo simples aos tubos originarios e foram elles mantidos em estufa até Fevereiro de 1927. Nessa data a amostra T. M. 1, semeada em SABOURAUD-glycosado em 29-VIII-24, repicada novamente deu desenvolvimento a culturas pujantes de bacillos de tuberculose, alcool-acido-resistentes.

Em 6 de Janeiro de 1928, procedeu-se a uma nova transplantação da semente do tubo original T. M. 1., semeada em Agosto de 1924, tendo havido abundante desenvolvimento em todos os tubos semeados.

*A vitalidade da semente no meio de SABOURAUD- glycosado se mantinha ainda, após 3 annos e 5 mezes.* As outras amostras não mais se desenvolveram.

As experiencias acima referidas demonstram *a possibilidade do bacillo da tuberculose manter-se em estado de vida latente em culturas artificiaes durante o praso de 2 annos e 7 mezes, recobrando a sua virulencia (na acepção da capacidade* de *reproducção) sem* perder os *seus caracteres morphologicos e culturaes, bastando para isso encontrar elementos* favoraveis ao seu desenvolvimento: CALOR, ELEMENTO NUTRITIVO E HUMIDADE.

* * *

Essas experiencias conduziram o nosso espirito á verificação da possibilidade de vida do bacillo da tuberculose em condições proximas ao saprophytismo natural. Para esse fim estabelecemos a seguinte serie experimental, cujo protocollo damos a seguir:

21 de Março de 1927—Foram semeados 2 balões de caldo glycerinado a 5 o/o em superficie com cultura em pelle de T. M. R. (amostra isolada de urina de homem, typo humano); 2 balões com cultura em pelle de T. H. A. (typo humano, isolado de escarro).

Os balões foram conservados á temperatura ambiente e expostos á acção da luz diffusa.

Na 1a semana todas as pelles semeadas foram ao fundo dos balões.

5-5-927—Em um dos balões semeados com T. M. R. (balão 1) a semente que fora ao fundo serviu de nucleo ao desenvolvimento de uma cultura de cogumelo (observação feita 48 dias depois da semeadura).

22-6-927 – Nessa data um fragmento da semente do balão 1, que accarretava comsigo uma particula de cultura do cogumelo, emulsionado em um pouco dagua physiologica, foi inoculado em 2 cobayas.

Estas cobayas apresentaram cancro e ganglios correspondentes infartados no prazo commum.

22-8-927—Nessa data foi extrahido um ganglio inguinal de uma das cobayas. Esfregaços do ganglio mostraram numerosos bacillos acido-alcool-resistentes, e mycelio. Com pús do ganglio foram semeados tubos de batata-glycerinada, PETROFF, e gelose-glycerinada em SABOURAUD.

11-10-927—As culturas se desenvolveram bem em batata e em PETROFF e em gelose-glycerinada e no meio de conservação de SABOURAUD.

Nos esfregaços teitos com o material retirado dos tubos de PETROFF e conservação de SABOURAUD, foram vistos abundantes mycelios, ao lado de bacillos acido-alcool-resistentes, com bastonetes GRAM positivos.

Nesta data procedeu-se á repicagem desses tubos para meios proprios á tuberculose, assim como tambem para meio de SABOURAUD. Neste ultimo meio desenvolveu-se uma cultura de actinomyces.

30-11-927—As sementes depostas nos balões em 21-3-927, foram retiradas e inoculadas em 8 cobayas, obedecendo á seguinte serie:

Balão n. 1. Tuberculose renal + cogumelo actinomyces: 2 cobayas.

Balão n. 2. Tuberculose renal + cogumelo não caracterisado: 2 cobayas.

Balões III. IV. V e VI—com T. M. 1 e T. H. A.—caldo esteril limpidos: 2 cobayas para cada balão.

Durante o mez de Dezembro morreram as cobayas correspondentes aos balões III e IV, sem lesões tuberculosas. As outras se conservaram vivas sem manifestações de doença até a data actual.

Dessas experiencias decorre que *o bacillo da tuberculose foi capaz de viver em latencia no interior do caldo de cultura, á temperatura ambiente e exposto á luz, diffusa, sem se desenvolver, e snpportando a concurrencia vital com o desenvolvimento de uma cultura de cogumelo durante o prazo minimo de 45 dias e maximo de 90 dias (até onde chegou a nossa observação), sem modificação de sua virulencia.*

Por outro lado foi elle acompanhado em *symbiose pelo actinomyces que tambem foi isolado da lesão da animal.*

Restava verificar se poderia ser tambem attribuida qualquer acção pathogenica a esse actinomyces.

Com esse fim procedeu-se á inoculação de uma cobaya com fragmento da cultura em SABOURAUD-conservação (1º repique do tubo de PETROFF, onde fora semeado o pus da cobaya primitivamente infectada).

No animal infectado com o actinomyces houve desenvolvimento de tuberculose. Nos ganglios inguinaes foram encontrados numerosos bacillos de KOCH. Não foi encontrada nenhuma fórma attribuivel ao actinomyces.

Uma verificação da cultura do actinomyces (2º repique) feita posteriormente mostrou a existencia de raros bastonetes acido-alcool-resistentes. Tratava-se por consequencia de resto da semente do tubo de PETROFF, passado para o meio de SABOURAUD. Uma cultura de actinomyces semeada em SABOURAUD (3º repique) não infectou a cobaya quando experimentada.

Assim, pois, *o actinomyces não apresentou poder pathogenico para a cobaya.*

A repicagem do balão "I" feita em 7-XII-927 para SABOURAUD deu desenvolvimento á uma cultura identica á que fôra obtida após a passagem desse cogumelo pelo organismo da cobaya.

*Verificou-se assim experimentalmente a concurrencia vital de um germen não pathogenico com um germem pathogenico em symbiose nas condições normaes do meio exterior, symbiose que se manteve por passagem no organismo animal, conservando-se ambos os germens com os seus caracteristicos physiopathologicos, isto é, um o seu poder pathogeno intacto (bacillo da tuberculose), o outro a sua não pathogenidade (actinomyces saprophyta).*

As sementes mantidas nos balões de caldo até Novembro foram nessa data inoculadas em cobayas que se mostraram sem alteração de saúde, nenhuma dellas se Infectando.

Os tubos semeados com o pús da cobaya infectada por essa amostra de tuberculose deram desenvolvimento a magnificas culturas luxuriantes, todas, porém, dotadas de forte poder chromogeno. Quer os tubos de PETROFF, quer os de batata-glycerinada ou os de gelose-glycerinada, mostraram culturas coradas em róseo salmão mais ou menos aceentuado, atè a côr de vermelho tijolo, entremeado com coloração crême.

É digno de nota e se deve accentuar que *a propriedade chromogena mostrou-se neste caso independente da constituição chimica, do meio. Do mesmo modo, não esteve ella ligada á edade da cultura do laboratorio, por isso que foi verificada nessa amostra immediatamente depois da passagem pelo organismo da cobaya,* quando anteriormente essa amostra não tinha poder chromogeno accentuado e que tambem não se manifestou nas culturas subsequentes áquellas obtidas após isolamento do germen do pús tuberculoso.

Os preparados microscopicos dessas culturas são tambem muito interessantes.

Nelles se observou a predominancia de fórmas em streptothrix.

## DISCUSSÃO

As experiencias acima relatadas nos suggerem considerações de valor pratico.

A possibilidade do bacillo da tuberculose se manter em estado de vida latente durante o prazo de 2 annos e 7 mezes, recobrando sua vitalidade pela addicção de elementos nutritivos que asseguravam ainda a conservação da vida da cultura original ao cabo de 3 annos e 5 mezes, falla muito alto em favor da grande resistencia do virus tuberculoso ás causas dysgeneticas do meio exterior.

Esta condição de resistencia e de vida latente ainda se tornou mais patente na serie experimental III.

Desta serie se conclue que a contaminação accidental por um actinomyces não se oppoz á vida symbiotica desse cogumelo com o bacillo de KOCH, conservando cada especie suas caracteristicas biologicas, a saber: não pathogeneidade do actinomyces e a pathogeneidade e virulencia do bacillo da tuberculose. *Essas experiencias nos mostraram, pois, que devemos manter grandes reservas sobre a destruição do virus tuberculoso, pelas condições dysgeneticas do meio exterior, e nos fazem pensar na possibilidade de infecções originarias de meios infectados".*

Ao mesmo pensar conduz a experimentação de SOPARKAR (16) que meverificou a virulencia de bacillos em escarros dessecados mantidos obscuridade mesmo após 309 dias.

Do exposto se deduz pois que o virus da tuberculose póde se manter em latencia de vida por prazo superior a 2 annos e 7 mezes, e viver em symbiose com um cogumelo não pathogeno por prazo de 90 dias, sujeitos as condições normaes do meio ambiente (acção da temperatura e da luz). Neste ultimo caso o virus não perdeu a sua virulencia nem a sua pathogeneidade.

*Não ha entretanto na litteratura sobre o assumpto documentação concludente que permitta affirmar a condição de vida normal saprophytica ao bacillo da tuberculose.*

II

*Pode o bacillo da tuberculose viver em condição saprophytica no organismo animal?*

É o caso do saprophytismo parasitario tantas vezes encontrado em clinica e que as seguintes observações esclarecem.

1—Doente de idade avançada. com bronchite chronica, sem bacillos de KOCH na expectoração ao exame microscopico.

A inoculação do escarro determinou na cobaya a formação do cancro da inoculação e a adenite classica com bacillos acido-resistentes.

O pús do ganglio reinoculado não determinou doença em segunda passagem, sendo reabsorvido.

2—Adolescente com tuberculose renal desde idade de 7 annos, comprovada por bacterioscopica e inoculação de urina.

O animal inoculado morreu por tuberculose generalisada no prazo de 2 mezes.

O adolescente que mantem permanente eliminação de bacillos tuberculosoe pela urina desenvolve-se normalmente e se encontra com 20 annos de idade.

A primeira destas observações mostra a possibilidade de existencia do germem em estado quasi saprophyta, incapaz já de determinar lesões lethaes no animal de experiencia emquanto que entretem o estado morbido em seu hospedador.

A segunda observação nos mostra a existencia de um germem tuberculigeno de virulencia grandemente attenuada para o seu portador, mantendo-se entretanto seu poder virulento e agressivo intacto para o animal de experiencia.

A seguinte observação de MOENKEBERG e ONETO (17) é ainda muito suggestiva.

Féto de mãe tuberculosa, extrahido por cesareana, sem lesões tuberculosas placentarias, revela por inoculação do sangue do cordão a presença do virus que determinou a infecção classica da cobaya.—O féto se desenvolveu normalmente e até a idade de anno e meio nada aparentou que revelasse doença.

As observações clinicas acima transcriptas mostram claramente uma condição especial de vida ao bacillo da tuberculose compativel com man-

festações de virulencia as mais diversas, que se objectivam na maior ou menor receptividade de organismo infectado.

Amostras quasi que apathogenas para os seus hospedadores conservam integralmente sua virulencia para animaes de laboratorio; amostras quasi avirulentas para os animaes de laboratorio, entreteem condições morbidas no organismo hospedador.

Em qualquer dos casos, entretanto é certo que *condições de saprophytismo ainda que incompletas mostram a possibilidade que tal funcção biologica se estabeleça por condições normaes.*

Um outro ponto a abordar no estudo do saprophytismo parasitario é o da existencia possivel do bacillo da tuberculose, na intimidade dos tecidos, sem determinar lesões anatomicas, conservando ou não a sua pathogenidade para os animaes de laboratorio. As verificações experimentaes de todos os que se vem occupando com o estudo dos elementos filtraveis do virus tuberculoso, dão forte testemunho do phenomeno referido.

Do exposto se deduz pois *que o bacillo da tuberculose em condições especiaes de parasitismo pode soffrer modificações em sua virulencia de sorte a mostrar um estado particular de saprophytismo relativo.*

III

*Deriva o bacillo de KOCH de uma fonte saprophytica ?*

A resposta experimental a este conceito só pode ser dada pela verificação do augmento de virulencia progressivamente obtido por adaptação parasitaria dos saprophytas banaes, ou pela constatação da reversibilidade dos typos de tuberculose conhecidos, que attinja á criação de especies apathogenas.

A documentação experimental apresentada em resposta a 1a questão do presente trabalho attende ainda a questão que estudamos.

Não tem sido possivel crear, partindo de saprophytas banaes, um typo de acido-resistentes com os caracteres integraes, morphologicos, culturaes e pathogenicos attribuiveis aos bacillos da tuberculose.

Mostra entretanto a litteratura sobre o assumpto, experimentação, ainda que contraditada, tendente a evidenciar a reversibilidade dos typos de tuberculose.

DUBARD, BATAILLON, TERRE, BERTARELLI, e BOCCHIA, DIEUDONNÉ, SAN FELICE, KLEBS, SCHROEDER (18) fallam sobre a possibilidade de adaptação de bacillos tuberculosos de mammiferos a organismos de animaes de sangue frio, ou vice-versa. permittindo uma verdadeira transformação de um typo em outro typo.

RAMON et RAVAUT, LUBARSCK e MAYER, AUCHÉ e HOBBS, LEDOUX-LEBARD, MOELLER, A. WEBER e TANTE, VON BETEGH (19) CALMETTE não conseguem obter a adaptação do virus tuberculoso humano ou bovino aos animaes de sangue frio.

Si acaso nada de concludente resulta da experimentação que acaba de referir, é entretanto possivel demonstrar experimentalmente modificações impressas a amostras de tuberculose typicas, que, transitorias, permittem a regressão ao typo original, ou, permanentes, dão origem á constituição de uma nova raça.

TATSO BURO, YABE, MASONA SHIBATO, JOSHITO KABAYASHI (20) em 17 amostras do bacillo de KOCH observam duas variedades anomalas isoladas directamente de dois casos de tuberculose pulmonar, pelo methodo de PETROFF.

Estas duas variedades T. Y. 1 e T. Y. 2, apresentavam os seguintes caracteres: não eram acido-resistentes, coravam-se facilmente pelas côres basicas de anilina e eram GRAM positivas, morphologicamente semelhantes a um stretothrix, desenvolviam-se egualmente bem em meios communs e glycerinados a temperatura de 37oC. em 24 á 48 horas.

Mostravam fraco poder pathogeno para a cobaya cujas lesões não apresentavam nenhuma semelhança com lesões de tuberculose verdadeira.

As provas de fixação de complemento, com o sôro de cobayas inoculadas com essas amostras, quando utilisado o antigeno de BESREDKA na maioria dos casos foram negativas, emquanto que foram sempre positivas com o sôro de cobaya inoculada com tuberculose, quando utilisado como antigeno emulsões de T. Y. 1, e T. Y. 2.

Passando essas amostras novamente por meio PETROFF ou de BESREDKA com ovo, ao cabo de 3 a 8 gerações readquiriam a acido-resistencia e a morphologia do verdadeiro bacillo da tuberculose, assim como o seu poder pathogenico para as cobayas que morriam com tuberculose generalisada.

CALMETTE (21) com a B. C. G. realisou a segunda affirmação. Foi a CALMETTE possivel com GUERIN obter por artificio de culturas (meios biliados) uma raça de bacillo que não produz tuberculose no organismo dos animaes sensiveis, mas que conserva sua aptidão a secretar tuberculina, e a servir de antigeno; ella permanece toxica e não se desenvolve senão ás proximidades de 38oC.

Em intima correlação com o estudo do saprophytismo se acha o problema da mutação bacteriana.

Cabe a FERRAN (21 ter sido o genio pioneiro que abriu o caminho ao estudo das anomalias observadas no desenvolvimento do cyclo da vida do bacillo de KOCH.

Em memoravel communicação á Acad. de Sciencias e á Sociedade de Biologia de Paris em 1897 lançou FERRAN as bases de sua doutrina que desde então empolga os biologistas no afan das confirmações e das contradictas.

A demonstração dada por este sabio do pleomorphismo e da profunda modificação biologica determinadas á biologia do bacillo de KOCH por influencias exteriores; perda de acido-resistencia, acquisição de mobilidade, desenvolvimento em anaerobia, perda de virulencia, como se encontra nas raças artificiaes creadas nas culturas homogeneas, são acquisições definitivas, confirmadas pela experiencia universal.

Acreditando assim em verdadeira mutação FERRAN confere o caracter saprophyto ao elemento pathogenico. Foi esta a base orientadora do theoria que FERRAN defende com a pertinacia sómente possivel na defeza dos principios que se creem exactos.

Se possivel foi obter por modificações tão profundas da biologia do bacillo de KOCH uma raça avirulenta, condições favoraveis podem reintegral-o em sua funcção pathogenica, por nova adaptação parasitaria, e reco-

nhecendo no meio exterior a origem da vida em qualquer das suas manifestações, synthetisa FERRAN a sua doutrina denominando *alpha* ($\alpha$) a todas as bacterias não acido-resistentes, de procedencia diversas, capazes de, quando em culturas puras, determinar nos animaes injectados a formação de tuberculos e a presença de bacillos de KOCH.

A esse bacillo, termo final da evolução do saprophita ao parasita pathogeno, denominou FERRAN *gamma* ($\gamma$).

Entre a bacteria *alpha* e a bacteria *gamma* ha um grupo de bacterias que mostra raças distinctas, mais ou menos proximas por seus caracteres biologicos, das bacterias *alpha* ou das bacterias *gamma*. A este grupo FERRAN denominou bacterias *béta* ($\beta$).

As bacterias *gamma* quando em caldos artificiaes de cultura perde algumas de suas propriedades, originando uma sub-raça não acido-resistente, que elle denominou *epsilon* ($\varepsilon$). Entre as bacterias *gamma* e *epsilon* figura a variedade acido-resistente emmulsionavel designada pelo nome de bacterias *delta* ($\delta$).

A doutrina de FERRAN, ainda que não universalmente comprovada encontra fortes argumentos em factos de observação experimeotal. O pleomorphismo do bacillo do KOCH não soffre mais contestação. A verificação de fórmas culturaes anomalas vem dia a dia sendo comprovadas por varios pesquizadores.

ARLOING et COURMONT (23) DOSTAL (24) VAUDREMER (25) REENSTIERNA (26), PLA y ARMENGOL (27), KIRCHNER (28), ainda que sob pontos de vista diversos, confirmam o pleomorphismo em culturas.

MELLON e ELISABETH JOST (29) verificaram lesões de natureza tuberculosa capazes de determinar a tuberculose verdadeira quando reinjectadas, e devidas um micro-organismo GRAM-negativo, semelhante aos paratyphicos.

PETROFF, BRANCH and STEENKEN, Jr. (30) obteram a dissociação da B. C. G. em colonias avirulentas "R" e colonias virulentas "S".

SWEANY (31) obteve fórmas de degeneração em condição não acido-resistente, granulares, cocoides, bacillares que revertem á fórma typica após passagem por animal. Algumas destas fórmas não podem ser regeneradas em fórmas acido-resistentes.

Em minhas experiencias partindo de amostras do typo humano, antigas em laboratorio, sem passagem por animal, obtive em sub-culturas em caldo-glycerinado e em caldo simples um bacillo GRAM-negativo se desenvolvendo em profundidade.

A primeira cultura feita mostrava filamentos granulosos acido-resistentes em cujas pontas terminaes de ramificação se apresentavam pequenas particulas não acido-resistentes appensas, sob a fórma de bastonetes. Em campos diversos dos preparados se viam essas mesmas fórmas reunidas em abundancia em estado puro.

Foram obtidas culturas dessas fórmas em estado puro em duas gerações successivas, entre o 5º e 10 dias após a sementeira. Não se desenvolveram em gelose inclinada e se extinguiram após a 2a passagem em caldo, onde não eram mais vistas estas fórmas após a 3a passagem, permanecendo entretanto o caldo levemente turvo.

Por menos cocludentes que sejam as observações acima declaradas deixam ellas entrever a possibilidade de uma mutação bacteriana no typo dos elementos previstos por FERRAN, e só a continuidade e repetição das experiencias permittirá um iuizo definitivo.

Assim concluiremos:

*É possivel a mutação do bacillo de KOCH em typos pleomorphicos e avirulentos, mas, apezar da grande serie de factos experimentaes accumulados, tendentes a julgar da possibilidade da transformação por caracteres adquiridos hereditariamente, ou por mutação das bacterias saprophytas acido-resistentes ou não, em verdadeiros bacillos de KOCH, não se poude ainda obter a demonstração peremptoria desse phenomeno.*

## BIBLIOGRAPHIA


1—W. KOLLE, H. SCHLOSSBERGER und W. PFANNESTIEL—Tuberkulose—Studien IV—Ueber die Tierpathogenität u. s. w. Deutsch. Med. Woch.—21 April—937.

2—JOSEF YGERSHEIMER and HANS SCHLOSSBERG—Tuberkulose Studien V—Zur Pathogenität der Säurefeste Bakterien. in besonderen der Passage stamme säurefester Bazillen. Deutsch. Med. Woch.—12 Mai 1921, pg. 526.

3—SAN FELICE—Anali de Ygieni XXXI—1921—pg. 457.

4—BRUNO LANGE—Weitere Untersuchungen über einige der Tuberkelbazillen verwandete. Saurefeste Saprophyten. Deutsch. Med. Woch 182—Juli 1920—pg. 763. Zeilscho. F. Hyg.—T. XCIII—1921. pg. 43—73. Deutsch. Med. Woch.—17 March 1922. pg. 350.

5—BRUNO HEYMANN und WALTER STRAUSS—Deutsch. Med. Woch. 28 Juillet 1922. pg. 999 und 1000.

6—DAL COLLO, G. P.—Contributo alla conosceza dei rapporti fra bacillo tubercolare ed altri germi ácido-resistenti. Boll. Inst. Sierot. Milaneze.—T. III—1924. pg. 95.

7—MAHER STEPEN—The origin of the tubercle bacillus. The Amer. Rev. of Tub.—Vol. XII—n. 4. Dec. 1925.

8—A. CALMETTE—Sur la question du transformisme des bacilles paratuberculeux et des bacilles tuberculeux. Bul. de l'Inst. Pasteur. T. XXII—pg. 593.

9—PHILIBERT, COURMONT, CANTACUZENE, BEZANÇON—Congrés International de la Tuberculose.—Paris—1905.

10—IRIMESCU—Id. Id.

11—OGAWA, TOYO—Untersuchungen über Komplementbildung bei Tuberkulose. II Mil. Zeitschrift für Im. Forsch. Band.—44 Sept. 1925—2/3—S. 218—244.

12—DESCOS, RODET et GALAVIELLE—Congrés Int. de la Tuberculose. Paris—1905.

13—J. AUCLAIR—Les modifications du bacille tuberculeux humain. Aptitude du bacille de KOCH á se transformer en saprophyte. Arch. de Med. Exp. n. 4—Juillet 1903.

14—LEON KARVACKI—Saprophytisme des Bacilles Tuberculeux.
Cont. Rend. Soc. Biol.—T. C. n. 13—1929—pg. 1152.

15—A. FONTES e BARBOSA DA CUNHA—Inst. Oswaldo Cruz.
Supplemento das Memorias n. 3. Nov. 1928.

16—M. B. SOPARKAR—The Vitality of the Tubercle Bac. outside the Body.
Indian Jor.—of Med. Ses.—T. IV—f. 4.--April 1917—pg. 627, 650.

17—MOENKEBERG e ONETO—2º. Congresso Pan Americano de Tuberculose—Cordoba—Out. 1927.

18—DUBARD, BATAILLON, TERRE, BERTARELLI e BOCCHIA, DIEUDONNE, SAN FELICE, KLEBS, SCHROEDER—Rev. Med. de Hamburgo n. 7—Julio 1925. Numero em homenage del LX aniv. del Prof. Dr. L. BRAUER.

19—RAMON et RAVAUT, LUBARSCH, et MAYER, AUCHE et HOBBS, LEDOUX, LEBARD, MOELLER, A. WEBER et TANTE, VON BETEGH—Apud.—CALMETTE—op. cit. n. 8.

20—TATSO BURO, YABE MASONA, SHIBATO KABAYASHI—Studies. on the greatly changed form of tubercle bacillus etc. etc. (red. at. the second Congress of the Japan 1927. Tuberculosis Ass.—Med. in Osaka—April 6.

21—A. CALMETTE. Op. Cit. (8).

22—FERRAN J.—Las mutaciones bacillares en lo que afectan a la etiologia la patogenia, la profilaxis y la terapeutica de las infec. pre-tuberculosas e tuberculosas.

23—ARLOINH—Sur l'obtention de cultures homogènes du bacille de la tuberculose.
C. R. Ac. de Soc.—9 Mai 1898.

—ARLOING, et GOURMONT—C. R. Ac. de Sc.—8 Out. 1898—pg. 312.

24—DOSTAL—Wien. Med. Woch. 1913 n. 12 e 15.

25—VAUDREMER—Le Bacille Tuberculeux.
1 Vol.—Presses Universitaires.—1927.

26—REENSTIERNA, J.—Sur la vie non acido-résistente du microorganisme de la tuberculose.
Arch. del l'Inst. Pasteur de Tunis--T. XV—n. 4—1926. pg. 309.

27—PLA y ARMENGOL—Concepto clinico de la tuberculosis et. etc.
Publicações do Inst. Ravetllat-Pla—Barcelona—1927.

28—KIRCHNER, O.—Studien Zur Morphologie und Biologie des Tuberkuloseerregers. III—Nicht saurefeste Formen in Saponin-Glycerin-Bouillon-Kulturen.
Beitrage zur Klinik der Tuberkulose. 70 Band—Heft 3 pg. 375.

29—MELLON, RALPH, R. and ELISABETH L. JOST. Experiments on the Filterability of the granular Phase of the Tubercle Bacillus.—The Amer. Rev. of Tuberc. Vol. XIX—Mai 1929—n. 5—pg. 483.

30 – PETROFF S. A., BRANCH, ARNOLD, STEENKER Jr. WILLIAN— A Study of Bacillus CALMETTE GUERIN, etc. The Amer. Rev. of Tuberc.—Vol. XIX—Jan. 1929 – n. 1— pg.

31 – SWEANY, HENRY C. – The Regeneration of Acid-Fastness in Apparently Degenerated Tubercle Bacilli.
The Amer. Rev. of Tuberc.—Vol. YVIII—Nov. 1928 – 630.

# SAPROPHITISM OF THE TUBERCULOUS BACILLUS (1)

By Dr. A. FONTES

Chief of Service of the Oswaldo Cruz Institute

(Official Reporter of the Thema)

The notion of *saprophytism* has to be considered under various aspects when studying the bacillus of tuberculosis: under the aspect as classifically admitted, biologic notion; under the aspect of avirulence for the host, pathogenic notion; aspect of reversibility of characters, that may allow classifying the agent of the tuberculous infection as proceeding from a unic source, the starting point of apathogenous, symbiotic, or virulent types, phylogenetic notion.

## I

*Does the tuberculous bacillus in saprophytic life exist in the external medium?*

A natural tendency of mind is the belief that, kinds, actually pathogenic, may have adapted themselves to parasitary life; some ones not completely, still able to perform the usual function and only occasionally living parasitically; some others which have adapted themselves to parasitary life to such an extent that they have lost their property of living under the conditions of the external medium, if not completely, at least, almost entirely. These species may live in conditions of saprophytic life, only under special circumstances, this is in the microbiological sense, or subject to constant changes of the external medium.

The study of the saprophytic microbian flora revealed the existence of a class of microörganisms, morphologically similar to the KOCH's bacillus, and like same characterized by the peculiar structure which bestow upon them the property of being acid-fast.

This class, also known as para-tuberculous germs, shows specimens in the soil, vegetables, in various animal products; and, should, by chance, the tuberculigenous property of any one of these species be demonstrated, this would mean a great light thrown not only upon the microbiologic but also upon the medical and hygienic problems, in relation to tuberculous infection.

Verifications directed in this way, still contradictory, did not find, up to this day, a practical confirmation.

The experiments of KOLLE, SCHLOSSBERG and PFANNESTIEL (1) who, by inoculating acid-fast saprophytic bacilli and tuberculous bacilli of of cold-blooded animals, succeeded by intra-peritoneal injection to Guinea pigs, through successive passages, in determining generalized tuberculous

(1) Memorial read before the 2nd Pan American Congress of Tuberculosis, held in Rio de Janeiro, from the 30th of June to 7th of July 1929.

infection; those of JOSEF IGERSHEIMER and H. SCHLOSSBERGER (2), who, injecting para-tuberculous bacilli within the anterior chamber of the eye of Guinea pigs, provoked severe lesions similar to those caused by tuberculous bacilli; those of SAN FELICE (3), who got to typical tuberculous infections starting from an acid-fast streptothrix, isolated from a rat, are in opposition with BRUNO LANGE's, (4) effected with acid-fast mateterial from the respiration apparatus, BRUNO HEYMANN and WALTER STRAUSS' (5) and DAL COLLO's experiments (6).

MAHER (7) reports meanwhile he has isolated, from a traumatic abscess in scrotum, an acid-fast bacillus with the characters of the smegmatic bacillus, which, after passage in potato glycerine broth in dry oven, gave birth, three weeks later, to small colonies with the appearance of colonies of the bacillus of human tuberculosis.

These colonies, used to infect a Guinea pig intraperitoneally, caused to appear the frame of generalized tuberculosis, further transmissible.

This clinical case ended 6 months later by the death, caused by pulmonar active tuberculosis, though clinically undetected by occasion of the infection of the scrotum.

CALMETTE (8), with BOQUET and NEGRE, did not succeed, even after 10 passages through Guinea pigs and rabbits, in getting an increase of virulence of a *phléole* strain, of MOELLER, nor in determining the power of provoking the formation of tubercles; they verified, however, that, after passage through the animal organism, this strain was more easily cultivable at a temperature of 37°C, and it determined the phenomenon of KOCH in tuberculous Guinea pigs, in spite of having no protective power in relation to subsequent inoculations of the tuberculous bacillus.

A further result from the observation of a great many investigators, is that the condition of pathogenicity may be, however accidentally, showed by the common acid-fast bacilli, or by para-tuberculosis. This conclusion is that of PHILIBERT, COURMONT, CANTACUZENE, BEZANÇON (9); and even biological reactions have been brought, which mean a similarity between the para-tuberculous and the true tuberculous bacilli.

The para-tuberculin ef IRIMESCO (10), the antigenic function proved by OGAWA (11), the study of the biology of various strains (COURMONT, CANTACUZENE, DESCOS, RODET and GALAVIELLE (12) would tend to prove in favor of the possible relationship between common acid-fast bacilli and the KOCH's bacillus.

If practically it was till now impossible to demonstrate clearly the tuberculigenous pathogenous function of saprophytic acid-fast bacilli, in order to allow of a positive phylogenetic relationship between these and the bacilli of tuberculosis to be established, one may however affirm that: *special circumstances may act upon these latter transforming them into types which, little by little, become more similar to the common acid-fast type, in consequence of deep alterations of their biology, turning them avirulent, modifying their biochemism so as to make them lose the main characteristics of the pathogenous bacilli, in narrow relation with the life condition of forced parasitism.*

The former verifications of AUCLAIR (13 are also favorable to such a thesis.

Most interesting observations have been lately communicated to the Polish Society of Biology by LEON KARVACKI (14). KARVACKI has in his power ten strains of tuberculous bacilli which germinate and develop in cultures at the laboratory's temperature. Four realize the full saprophytic frame: easy development in common media, at laboratory's temperature, avirulence for laboratory animals, chromogenic function well marked. These strains, of human and equine origin, show also deep alterations of their cultural metabolism; modification and lowering of their fermentative power in some, a marked smell of trimethylamin, and the production of a weak tuberculin. The remaining 6 samples show till now a defficient saprophytism.

Notwithstanding their developing at the air temperature, this development is a slow one, and can only take place in media fit to tuberculosis. Already a part of them is apathogenous for Guinea pig.

The observations I am carrying on since the year 1923 in this direction, appear to be an eloquent statement in favor of the possible saprophytism of the bacillus of tuberculosis. Is is my duty to write again what I published with BARBOSA DA CUNHA (15), for a better understanding of the conclusions.

* * *

"Cultures of avian and bovine tuberculosis, already kept a long time ago in the laboratory, with 5 months culture in glycerine gelose at 5 o/o, were transplanted on the 5. VII. 23 to SABOURAUD's maltosed medium. and SABOURAUD's maltosed and glycerined medium at 5 o/o. The cultures developed luxuriantly in the tubes containing the glycerine medium, but were less abundant in the tubes without glycerine. The strains smeared acted likewise, without having been possible to establish an appreciable difference in the development of the respective colonies, when compared in the same media (Observation made on 11. XI. 1923).

By that date, we effected again a passage through the same media, and observed then, one month later, more abundant cultures. These were kept up to the month of April 1924, when we then undertook the verification with new series, making use of the oldest strains of the collection at the Institute. Among these, we must point out that of T. M. 1 (human type) which, by that opportunity, had suffered some 25 successive passages through artificial media, without any passage to animal whatever, and which had kept all its virulence and classical morphologic and cultural characters.

Not only this strain, as also another of the human type (T. M. 4) and others of the bovine type were maintained by successive passages in SABOURAUD's maltosed, glycerine-glycose-maltosed, glycerine-glycosed, preserving, preserving-glycerined, and gelose-glycerined media, until the month of October 1924, without noteworthy or marked differences having been recorded about the development of cultures, or the virulence of the strain.

Repeated examinations of these cultures showed that they always kept their morphologic rod-like form, more or less granulous, their more or less marked acid-fast condition and their virulence without any note-

worthy alteration. The same occurred in cultures maintained by renewed passages in liquid media of the same composition as the SABOURAUD (excepting the gelose) and into the medium used for preparing the vaccine of carbunculus symptomaticus, strongly favorable to weakening this germ, and consisting of flesh broth, serum of horse and glycose.

Still in this case, the strains of tuberculosis smeared developed without losing any noticeable part of their virulence and without any sensible alteration of their morphology and cultural characters.

Some ones of the tubes of culture in SABOURAUD's maltosed, glycerine maltosed and glycose-maltosed were left out of the dry oven, exposed to diffuse light, plugged with a simple cork, without replanting. They were kept thus from August 1924 to November 1926, and were afterwards smeared again in new tubes of SABOURAUD's medium. *The smearings did not develop in the replanted tubes, in spite of these having been kept in the dry oven for 45 days.*

Then, we added a small quantity of plain broth to the original tubes, and these were maintained in the dry oven up to the month of February 1927. By that date, the strain T. M. 1 smeared on SABOURAUD-glycosed medium on the 29. VIII. 24, having been replanted again, gave birth to luxuriantly developing cultures of acid-alcohol-fast tuberculous bacilli.

On the 6th January 1929, we undertook a new transplanting of the smears from the original tube T. M. 1, which had been smeared in August 1924, and noted a fair development in all the smeared tubes.

*The vitality of the culture on SABOURAUD's glycosed medium lasted still, after three years and five months.* The other strains did not more develop.

The experiments above referred to, demonstrate *the possibility for the bacillus of tuberculosis to keep in condition of latent life in artificial cultures for a delay of 2 years and 7 months, recovering its virulence (in the meaning of capacity of reproduction) without losing its morphologic and natural characters, it being sufficient to find elements* favorable to its development: HEATH, NUTRITIVE ELEMENT and HUMIDITY.

* * *

These experiments induced us to verify the possibility of the bacillus living under conditions near to the natural saprophytism. For this purpose, we undertook the following series of experiments, report of which we give hereunder:

12st March 1927.—2 balloons containing broth with 5 o/o glycerine were smeared superficially with culture in skin of T. M. R. (a strain isolated from human urine, human type); 2 baloons with a culture in skin shape of T. H. A. (human type, isolated from sputum).

These balloons were kept at laboratory's temperature, exposed to the action of diffuse light.

During the first week, all smeared skins had sunk to the bottom of the balloons.

5. 5. 1927.—In one of the balloons smeared with T. M. R. (balloon N. 1) the smearing sunk, served as a base for the development of a fungial culture (observation made 48 days after smearing).

22. 6. 1927.—By that date, a fragment of the smearing in balloon N. 1, which bore a particle of the fungial culture, was emulsioned with a small quantity of a saline solution, and inoculated to 2 Guinea pigs.

These Guinea pigs showed a chancre and the corresponding ganglia with infarct within the usual delay.

22. 8. 1927.—By that date, an inguinal ganglion was extirpated from one of the Guinea pigs. Rubbings of this ganglion contained numerous acid-alcool-fast bacilli with mycelia. With the pus of the ganglia, we smeared tubes containing potato glycerine, PETROFF's medium, and Glycerined gelose in SABOURAUD's medium.

11. 10. 1927.—The cultures developed fairly in potato and in PETROFF's, in glycerined gelose and in SABOURAUD's preserving medium.

In the rubbings obtained with the material taken off the tubes of PETROFF and SABOURAUD conservation, abundant mycelia were observed, together with acid-alcohol-fast bacilli with GRAM-positive rods.

By that time, we undertook a new smearing of the contents of these tubes into media fit for tuberculosis, as also into SABOURAUD's medium. The last stated medium showed development of a culture of actinomyces.

30. 11. 1927.—The germs smeared in the balloons on 21. 3. 1927, were taken off them, and inoculated to 8 Guinea pigs, according to the following series:

Balloon 1.—Renal tuberculosis plus fungos actinomyces: in 2 Guinea pigs.

Balloon 2.—Renal tuberculosis plus uncharacterized fungos: in 2 Guinea pigs.

Balloon III. IV. V and VI with T. M. 1 and T. H. A.—sterile limpid broth: 2 Guinea pigs for each balloon.

During the month of December, the Guinea pigs corresponding to balloons III and IV died, without tuberculous lesions. The other ones kept alive, without any sign of disease up to this day.

From these experiments results that *the bacillus of tuberculosis was able to live latently within the culture broth, by laboratory's temperature and exposed to diffuse light, without developing, and bearing vital competition with a developing culture of a fungus, for a delay of at least 45 days, the maximum being 90 days (this is the point where our observation ended) without any change in its virulence.*

On the other side, it was accompanied *symbiotically by the actinomyces that was equally isolated from the lesion in the animal.*

Still remained to ascertain whether any pathogenic action could be ascribed to this actinomyces.

For this purpose, we realized the inoculation, in one Guinea pig, of a fragment of the culture in SABOURAUD-preserving medium (1st replant of the PETROFF tube, in which the pus of the originally infected Guinea pig had been smeared).

In the animal infected with the actinomyces, there was a development of tuberculosis. In the inguinal ganglia, numerous KOCH's bacilli were found. No form that may lead to think of actinomyces was visible.

A verification of the culture of the actinomyces (2nd replanting) effected afterwards, proved the existence of rare acid-alcohol-fast rods. Consequently, it could be nothing else but the remainder of the smearings in the PETROFF's tube, passed over to the SABOURAUD's medium. A culture of actinomyces smeared in SABOURAUD (3rd replantiug) did not infect the Guinea pig when tried.

Consequently, *the actinomyces did not show any pathogenic power for Guinea pig.*

Replanting the contents of balloon "I", effected on the 7. XII. 1927 to SABOURAUD's medium, gave way to developing a culture identical to that obtained after passage of this fungus through the organism of the Guinea pig.

*Thus was experimentally verified the vital competition of a non pathogenic germ in symbiosis, under normal conditions of the external medium, which symbiosis lasted by means of passage into animal organism, both kind of germs keeping all their own physiopathologic characters, that is to say, one its pathogenic power untouched (bacillus of tuberculosis) the other one its non pathogenicity (actinomyces saprophyta).*

The semen kept in the balloons with broth until November, were by that date inoculated to Guinea pigs, which kept in perfect condition of health, none of them having been infected.

The tubes smeared with the pus of the Guinea pig infected with this strain of tuberculosis provoked development of splendidly luxuriating cultures, all, of which, however, possessing a strong chromogenic power. Both the PETROFF's tubes, and those with glycerine potato as also glycerine gelose, showed cultures more or less markedly colored in salmon rose, and even up to a brick-red shade mixed up with creamy colour.

Noteworthy it is, and on this we must insist, that *the chromogenic property showed, in that case, independent from the chemical composition of the medium. Likewise it was not bound anyhow with the age of the culture, the fact being that it could be verified in that strain immediately after passage in the Guinea pig's organism,* whereas that same strain did not possess any marked chromogenic power, nor such appearing in cultures subsequent to those obtained after isolation of the germ of the tuberculous pus.

The microscopic preparations of these cultures are also worth of great interest.

Forms in streptothrix were there observed, predominating.

## DISCUSSION

The experiments above referred to lead us to formulate some considerations of practical value.

The possibility for the bacillus of tuberculosis to keep itself in condition of latent life for a delay of 2 years and 7 months, recovering afterwards its vitality by addition of nutrient elements which still ensure the continuation of the living state of the original culture after 3 years and 5

months, should be an argument in favor of the great resistence of the tu berculous virus to dysgenetic causes of the external medium.

This condition of resistence and latent life is made still more obviou in the experimental series III.

From this series, one may conclude that accidental contamination b an actinomyces does not prevent the symbiotic life of this fungus togethe with the KOCH's bacillus, each species keeping its own biologic character say: non pathogenicity of the actinomyces, pathogenicity and virulence o the bacillus of tuberculosis. *These experiments proved us, accordingly, w must be most reserved with regard to destruction of the tuberculous virus, b the external dysgenetic conditions*; *besides, they induce us to think of the pos sibility of infections starting from infected media.*

This supposition shonld also receive some support from the expe riment of SOPARKAR (16) who verified the virulence of the bacilli in drie sputum kept in the dark even after 309 days.

From the foregoing may be deducted then, that the virus of tuber culosis can keep in latent life for a delay above 2 years and 7 months, an live in symbiosis with a non-pathogenous fungus during 90 days, subjec to the normal conditions of the surrounding medium (action of tempera ture and of light). In this latter case, the virus lost neither of its viru lence nor of its pathogenicity.

*There is, however, in literature about the matter, no definitive documen tation that may allow affirming the condition of normal saprophytic life o the bacillus of tuberculosis.*

II

*Can the bacillus of tuberculosis live in saprophytic condition in anima organism?*

It is but the case of parasitary saprophytism most frequently foun in clinic, and on which the following observations will bring some light.

1—Patient of advanced age, with chronical bronchitis, witho KOCH's bacilli being observed microscopically in experimentation.

Sputum inoculated to Guinea pig, determined in this the formatio of a chancre at the inoculation spot, and the classical adenitis with aci fast bacilli.

Pus of the ganglion reinoculated did not determine any disease, on second passage, being reabsorbed.

2—Young fellow with renal tuberculosis since the age of 7, confi med by bacterioscopy and inoculation of urine.

The animal we inoculated died of generalized tuberculosis within months.

This young man, who goes on eliminating tubercnlous bacilli throug urine, grows normally and is now 20 years old.

The first of these observations shows the possibility of the gerr existing under saprophytic condition, already unfit for determining morta lesions to the animal of experiment, however maintaining the morbid con dition in its host.

The second observation proves the existence of a tuberculigenou

germ, whose virulence shows extremely weakened for its bearer, keeping however its virulent and aggressive power for the animal of the experiment.

The following observation of MOENKEBERG and ONETO (17) is still more suggestive:

A fetus of tuberculous mother, delivered by cesarean section, without tuberculous placentary lesions, revealed, by inoculation of blood from the cord, the presence of the virus which determined the classical infection of Guinea pig.—The fetus developed normally and up to the age of one and a half year, did not show any sign of being infected.

The clinical observations as transcripted hereabove, show clearly a special condition of life for the bacillus of tuberculosis, compatible with the most varied manifestations of its virulence, which are made patent by a greater or smaller receptivity of the infected organism.

Strains, which would apparently be apathogenous for their bearers, keep their full virulence for laboratory animals; strains almost not likely to infect laboratory animals, may entertain morbid states in the organism of the host.

In any or other of these cases, however, one thing is certain, say: *conditions of saprophytism, notwithstanding being uncomplete, show the possibility af such biologic function establishing itself under normal conditions.*

Another point we must approach when studying the parasitary saprophytism, is the one referring to the possibility of existing the bacillus of tuberculosis, within the substance of the tissues, without determining there anatomic lesions, keeping or not its pathogenicity for laboratory animals. The results of the experiments of all those devoting themselves to the study of filtrable elements of the tuberculous virus, are a creditable witness of the phenomenon alluded to.

Of the foregoing may be deducted then, that *the bacillus of tuberculosis, under special conditions of parasitism may undergo alterations in its virulence, so as to show o particular state of relative saprophytism.*

## III

*Does the KOCH's bacillus derive from a saprophytic source?*

An experimental answer to this conceit can be given, only by verifying the increase of virulence to be progressively obtained by a parasitary adaptation of the common saprophytes, or by ascertaining the reversibility of the types of tuberculosis known up to now, which may result in the creation of apathogenous species.

The experimental documentation we expose here, in reply to the first question of the present work, attends also to the question we are now studying.

It has not been possible to create, starting from common saprophytes, a type of acid-fast bacilli with the integral, morphologic, cultural pathogenons characters which belong to the bacillus of tuberculosis.

Literature points out however on the subject, experiments which, notwithstanding having been subject to contradiction, show a tendency to make patent the reversibility of the types of tuberculosis.

DUBARD, BATAILLON, TERRE, BERTARELLI, and BOCCHIA, DIEUDONNE, SAN FELICE, KLESS, SCHROEDER (18) report of the possibility of the tuberculous bacilli of mammiferous adapting to organisms of cold-blooded animals, or vice versa, allowing thus a real transformation from the other type.

RAMON and RAVAUT, LUBARSCK and MAYER, AUCHE and HOBBS, LEDOUX-LEBARD, MOELLER, A. WEBER and TANTE, VON BETEGH (19) CALMETTE do not succed in adapting the human or bovine tuberculous virus to cold-blooded animals.

If anyhow nothing in conclusion is to be drawn from the experimentation I am referring to, it is at least possible to demosntrate experimentally the changes caused to strains of typical tuberculosis, which, being transient, allow them to go back to the original type, and if permanent, cause a new race to constitute itself.

TATSO, BURO, YABE, MASONA SHIBATO, JOSHITO KABAYASHI (20) in 17 strains of the KOCH's bacillus, observed two abnormal varieties isolated directly from two cases of pulmonar tuberculosis, by PETROFF's method.

These two varieties, T. Y. 1 and T. Y. 2, corresponded to the following characters: they were not acid-fast, were easily stained by basic aniline colours, and GRAM positive, morphologically similar to a streptothrix; they developed quite as well in common and glycerined media at a temperature of 37° within 24 to 48 hours.

They showed little pathogenic power for Guinea pig, and the lesions of these did not present any similarity with those of true tuberculosis.

The tests about complement fixation, with the serum of Guinea pigs inoculated with these strains, when making use of BESREDKA's antigen, were negative in most cases; on the other hand, they remained positive in every case with serum of Guinea pig infected with tuberculosis, whenever the antigens used were emulsions of T. Y. 1 and T. Y. 2.

These strains being again passed through PETROFF's or BESREDKA's medium with egg, had after 3 or 8 generations, the acid-fastness and morphology of the real bacillus of tuberculosis restored, as well as their pathogenic power for Guinea pigs, which died from generalized tuberculosis.

CALMETTE (21), with the B C. G., realized this second affirmation of ours. CALMETTE succeeded, together with GUERIN, to obtain, by an artifice of cultures (biliated media) a race of bacillus that does not provoke tuberculosis in the organism of sensible animals, but keeps its power of secreting tuberculin, and of actjng as an antigen; it remains toxical and does not develop, except when subject to a temperature about 38°C.

In very narrow correlation with the study of saprophytism stands the problem of bacterian mutation.

FERRAN has been the genial pioneer, who first opened the way to the study of abnormalities observed in the development of the life cycle of the KOCH's bacillus.

In a memorable communication read before the Academy of Sciences and the Society of Biology in Paris in the year 1897, FERRAN established

the basis on which his doctrine reposes, which doctrine attracts all the best of efforts of biologists, either in confirming or in contracting it.

The demonstration this very learned doctor made of the pleomorphism and the deep biologic alteration brought into the biology of the KOCH's bacillus, owing to external conditions; loss of acid-fastness, creation of mobility, development in anaerobic condition, loss of virulence, as observed in artificial races created in homogenous cultures, are definitive gains, confirmed by universal experience.

In his belief of such a real mutation, FERRAN ascribes thus a saprophytic character to the pathogenic element. This was the starting point on which FERRAN based the theory he defends with the pertinacy proper to those only who have full faith in the principles they think to be the truth.

If it has been possible to obtain by such deep alterations of the biology of the KOCH's bacillus, an avirulent race, certain favorable conditions may restore completely its pathogenic function, by a new parasitary adaptation. Then, recognizing the origin of life in any of its manifestations, to exist in the external medium, FERRAN synthetizes his doctrin in denominating *alpha* ($\alpha$) all non acid-fast bacteria, from various origins, likely to determine, when in pure cultures, in the inoculated animals, formation of tubercles with the presence of KOCH's bacilli.

To this bacillus, the final term of the evolution of the saprophyte to pathogenous parasite, FERRAN gives the name *gamma* ($\gamma$).

Between the ($\alpha$) bacteria and the ($\gamma$) bacteria, there is a group of bacteria which shows distinct races, more or less kindred by their biologic characters, to the $\alpha$ or the $\gamma$ bacteria. This group FERRAN names *beta* ($\beta$).

The *gamma* bacteria, when in artificial culture brothes, lose some of their properties, giving origin to a non acid-fast sub-race which he names *epsilon* ($\varepsilon$). Between the *gamma* and *epsilon* bacteria, there is an acid-fast emulsionable variety, whose designation is *delta* ($\delta$).

FERRAN's doctrine, though not universally confirmed and approved, finds strong arguments in facts of experimental observation. The pleomorphism of the KOCH's bacillus can no more be discussed. Day by day, the verification of abnormal cultural forms is confirmed by various investigators.

ARLOING and COURMONT (23) DOSTAL (24) VAUDREMER (25) REENSTIERNA (26) PLA y ARMENGOL (27) KIRCHNER (28), however, under different point of views, confirm pleomorphism in cultures.

MELLON and ELISABETH JOST (29) verified lesions of tuberculous nature able to determine genuine tuberculosis when injected anew, the same being caused by a GRAM negative microörganism, similar to the agents of paratyphus.

PETROFF, BRANCH and STEENKEN Jr. (30) succeeded in dissociating the B. C. G. into avirulent colonies "R" and virulent colonies "S".

SWEANY (31) got forms of degeneration in non acid-fast condition, these forms being granular, coccoid, bacillar, which turn back to the typical form after passage into animal. Some of these forms are not able to be restored to acid-fast forms.

In my experiments, starting from strains of the human type, old in the laboratory, without passage through animal, I obtained in sub-cultures of glycerine-broth and in plain broth, a GRAM positive bacillus that developed well in the depth.

The first culture made, showed granulous acid-fast filaments, at whose terminal point of ramification, small non acid-fast particles appeared pending, under the form of rods. In various fields of the preparations, these same forms were to be seen, abundantly united in pure condition.

Such forms in pure condition allowed us to obtain cultures in two successive generations, within the 5th and the 10th day of smearing. They did not develop on slanting gelose and desappeared after the second passage in broth. They were not more to be seen after a third passage, the broth remaining still slightly turbid.

In spite of not being absolutely conclusive the above stated observations, they allow to admit of a bacterian mutation in the type of the elements supposed by FERRAN. Only carrying on further experiences and having them repeated, may enable one to make a definite judgment on the subject.

Our own conclusion will be:

*The mutation of the KOCH's bacilli into polvmorphic and avirulent types is possible, but, in spite of the wide series of accumulated experimental facts, which show a tendency to admit the possibility of this transformation by characters acquired hereditarily, or by mutation of saprophytic* bacilli, *acid-fast or not, into real KOCH's bacilli, no peremptory demonstration of this phenomenon could be got at up to this day.*

## BIBLIOGRAPHY


1—W. KOLLE, H. SCHLOSSBERGER und W. PFANNESTIEL—Tuberkulose—Studien IV—Ueber die Tierpathogenität u. s. w. Deutsch. Med. Woch.—21 April—937.

2—JOSEF YGERSHEIMER and HANS SCHLOSSBERG—Tuberkulose Studien V—Zur Pathogenität der Säurefeste Bakterien. in besonderen der Passage stamme säurefester Bazillen. Deutsch. Med. Woch.—12 Mai 1921, pg. 526.

3—SAN FELICE—Anali de Ygieni XXXI—1921—pg. 457.

4—BRUNO LANGE—Weitere Untersuchungen über einige der Tuberkelbazillen verwandete. Saurefeste Saprophyten. Deutsch. Med. Woch 182—Juli 1920—pg. 763. Zeilscho. F. Hyg.—T. XCIII—1921. pg. 43—73. Deutsch. Med. Woch.—17 March 1922. pg. 350.

5—BRUNO HEYMANN und WALTER STRAUSS—Deutsch. Med. Woch. 28 Juillet 1922. pg. 999 und 1000.

6—DAL COLLO, G. P.—Contributo alla conosceza dei rapporti fra bacillo tubercolare ed altri germi ácido-resistenti. Boll. Inst. Sierot. Milaneze.—T. III—1924. pg. 95.

7—MAHER STEPEN—The origin of the tubercle bacillus. The Amer. Rev. of Tub.—Vol. XII—n. 4. Dec. 1925.

8—A. CALMETTE—Sur la question du transformisme des bacilles paratuberculeux et des bacilles tuberculeux.
Bul. de l'Inst. Pasteur. T. XXII—pg. 593.

9—PHILIBERT, COURMONT, CANTACUZENE, BEZANÇON—Congrés International de la Tuberculose.—Paris—1905.

10—IRIMESCU—Id. Id.

11—OGAWA, TOYO—Untersuchungen über Komplementbildung bei Tuberkulose. II Mil. Zeitschrift für Im. Forsch.
Band.—44 Sept. 1925—2/3—S. 218—244.

12—DESCOS, RODET et GALAVIELLE—Congrés Int. de la Tuberculose. Paris—1905.

13—J. AUCLAIR—Les modifications du bacille tuberculeux humain. Aptitude du bacille de KOCH á se transformer en saprophyte.
Arch. de Med. Exp. n. 4—Juillet 1903.

14—LEON KARVACKI—Saprophytisme des Bacilles Tuberculeux.
Cont. Rend. Soc. Biol.—T. C. n. 13—1929—pg. 1152.

15—A. FONTES e BARBOSA DA CUNHA—Inst. Oswaldo Cruz.
Supplemento das Memorias n. 3. Nov. 1928.

16—M. B. SOPARKAR—The Vitality of the Tubercle Bac. outside the Body.
Indian Jor.—of Med. Ses.—T. IV—f. 4.—April 1917—pg. 627, 650.

17—MOENKEBERG e ONETO—2º. Congresso Pan Americano de Tuberculose—Cordoba—Out. 1927.

18—DUBARD, BATAILLON, TERRE, BERTARELLI e BOCCHIA, DIEUDONNE, SAN FELICE, KLEBS, SCHROEDER—Rev. Med. de Hamburgo n. 7—Julio 1925. Numero em homenage del LX aniv. del Prof. Dr. L. BRAUER.

19—RAMON et RAVAUT, LUBARSCH, et MAYER, AUCHE et HOBBS, LEDOUX, LEBARD, MOELLER, A. WEBER et TANTE, VON BETEGH—Apud.—CALMETTE—op. cit. n. 8.

20—TATSO BURO, YABE MASONA, SHIBATO KABAYASHI—Studies. on the greatly changed form of tubercle bacillus etc. etc. (red. at. the second Congress of the Japan 1927. Tuberculosis Ass.—Med. in Osaka—April 6.

21—A. CALMETTE. Op. Cit. (8).

22—FERRAN J.—Las mutaciones bacillares en lo que afectan a la etiologia la patogenia, la profilaxis y la terapeutica de las infec. pre-tuberculosas e tuberculosas.

23—ARLOINH—Sur l'obtention de cultures homogènes du bacille de la tuberculose.
C. R. Ac. de Soc.—9 Mai 1898.

—ARLOING, et GOURMONT—C. R. Ac. de Sc.—8 Out. 1898—pg. 312.

24—DOSTAL—Wien. Med. Woch. 1913 n. 12 e 15.

25—VAUDREMER—Le Bacille Tuberculeux.
1 Vol.—Presses Universitaires.—1927.

26—REENSTIERNA, J.—Sur la vie non acido-résistente du microorganisme de la tuberculose.
Arch. del l'Inst. Pasteur de Tunis—T. XV—n. 4—1926. pg. 309.

27—PLA y ARMENGOL—Concepto clinico de la tuberculosis et. etc. Publicações do Inst. Ravetllat-Pla—Barcelona—1927.

28—KIRCHNER, O.—Studien Zur Morphologie und Biologie des Tuberkuloseerregers. III—Nicht saurefeste Formen in Saponin-Glycerin-Bouillon-Kulturen.
Beitrage zur Klinik der Tuberkulose. 70 Band—Heft 3 pg. 375.

29—MELLON, RALPH, R. and ELISABETH L. JOST. Experiments on the Filterability of the granular Phase of the Tubercle Bacillus.—The Amer. Rev. of Tuberc. Vol. XIX—Mai 1929—n. 5—pg. 483.

30—PETROFF S. A., BRANCH, ARNOLD, STEENKER Jr. WILLIAN—A Study of Bacillus CALMETTE GUERIN, etc. The Amer. Rev. of Tuberc.—Vol. XIX—Jan. 1929—n. 1—pg.

31—SWEANY, HENRY C.—The Regeneration of Acid-Fastness in Apparently Degenerated Tubercle Bacilli.
The Amer. Rev. of Tuberc.—Vol. YVIII—Nov. 1928—630.

# Molestia de HODGKIN

Pelo Dr. JOSÉ GUILHERME LACORTE

Sobre a nota que publicamos nestas "Memorias" a respeito do isolamento de diphtheroides de doentes atacados de molestia de HODGKIN, nota que foi apresentada á Sociedade Brasileira de Biologia a 29 de fevereiro deste anno, devemos fazer alguns commentarios e rectificações.

Por ignorarmos a sua publicação, não pudemos citar a these do Dr. ALCIDES MARQUES DA SILVA AYROSA: "Contribuição ao estudo da Molestia de HODGKIN" (São Paulo, 1923). Este trabalho sómente agora o recebemos, por intermedio do Dr. FLAVIO DA FONSECA, a quem o pedimos. O autor conseguiu, em um caso daquella molestia, isolar bacteria semelhante ao Corynebacterium hodgkini de BUNTING e YATES.

No mesmo mez em que apresentamos a referida nota, foi publicado novo trabalho sobre o assumpto, intitulado: "Contribuição ao estudo etiologico da molestia de HODGKIN" pelos Drs. SAMUEL B. PESSOA, CLOVIS CORREA e ALCIDES AYROSA. (São Paulo Medico, anno 1, fevereiro de 1929). Neste trabalho que só chegou á Bibliotheca do Instituto Oswaldo Cruz em maio, os autores referem-se ao isolamento que fizeram, em dois casos de molestia de HODGKIN, do diphtheroide em questão, com as caracteristicas do Corynebacterium hodgkini.

Em 1917 foi publicado nos Archivos Brasileiros de Medicina (pagina 417) um trabalho dos professores W. HABERFELD e C. LORDY sob o titulo "Contribuição ao estudo anatomico e clinico do syndromo de HODGKIN e do MYELOMA". Os autores não procuraram isolar o diphtheroide de que nos occupamos, mas sómente verificar o bastonete de FRAENKEL e MUCH, o que conseguiram em um caso.

Portanto, á bibliographia estrangeira citada cumpre acrescentar os bem elaborados trabalhos nacionaes aqui referidos.

Agosto de 1929.

# HODGKIN's disease

By Dr. JOSÉ GUILHERME LACORTE

We have to bring here some comments and rectifications refering to our paper published in the March issue of these "Memorials" in regard to the isolation of diphtheroids from patients attaked with HODGKIN's disease, paper that was read to the Brazilian Society of Biology on February 29th-1929.

Not being aware of its publication, we did not quote Dr. ALCIDES MARQUES DA SILVA AYROSA's thesis: "Contribution to the Study of HODGKIN's disease" (São Paulo, 1923). This work has come to us just now, through Dr. FLAVIO DA FONSECA, whom we asked for. The author succeeded in isolating, in a case of this disease, bacteria which was similar to the Corynebacterium hodgkini of BUNTING and YATES.

On the very month we read our paper, another new work was published under the heading: "Contribution to the etiological study of the HODGKIN's disease" by Dr. SAMUEL B. PESSOA, Dr. CLOVIS CORREA and Dr. ALCIDES AYROSA. (São Paulo Medico, year 1, February, 1929). In this work, which was received at the Library of the Oswaldo Cruz Institute last May, the authors refer as having obtained the isolation of the mencioned diphtheroid, with all the characters of the Corynebacterium hodgkini in two cases of the HODGKIN's disease.

In 1917, the Archivos Brasileiros de Medicina (page 417) issued a work of Prof. W. HABERFELD and Prof. C. LORDY, bearing the title: "Contribution to anatomical and clinical study of HODGKIN's syndrome and of the MYELOMA". The authors did not try to isolate the diphtheroid we refer to, but only to verify the presence of FRAENKEL and MUCH's bacillus, what they obtained in one case.

Consequently, to the foreign literature quoted, it is convenient to add the valuable and well elaborated brazilian works we mentioned above.

August, 1929.

# Pesquisas sobre a physiologia do lobo anterior da hypophyse e das glandulas sexuaes

Pelo Dr. THALES MARTINS

(Assistente do Instituto Oswaldo Cruz).

Os trabalhos recentes de ZONDEK e ASCHHEIM (1), SMITH e ENGLE (2) estabeleceram seguramente o papel do lobo anterior da hypophyse como regulador das glandulas sexuaes. E' sabido que a implantação do lobo anterior da pituitaria, ou as injecções de determinados extractos desse orgão, provocam nos animaes infantis, machos ou femeas, a puberdade precoce. O sexo, a especie ou a idade do animal doador não importam no resultado, qualitativamente, pelo menos entre os mammiferos.

As hypophyses de aves não dão resultados completos, (SMITH e ENGLE 2); LIPSCHÜTZ, KALLAS e WILKENS (3a), e assim tambem as de rans chilenas (Kalyptocephalus) durante o repouso sexual (LIPSCHÜTZ e PAEZ, (3b), ou mesmo em periodo de cio, (TH. MARTINS, 4) nas rans brasileiras Leptodactyllus. Em toda a serie de trabalhos ahi referidos, trata-se de implantações feitas em roedores infantis. Entretanto, HOUSSAY e GONZALEZ (5) observaram hypertrophia testicular nos sapos normaes ou hypophyseoprivos, após implantações de hypophyses de sapo.

Podemos considerar o papel estimulador da prehypophyse como geral nos mammiferos; nestes, resultados similares têm sido obtidos em grupos zoologicos os mais diversos, e até mesmo em primatas (ALLEN, 6).

A rapidez e a segurança com que os ovarios dos pequenos roedores reagem á prepituitaria, fez delles um test commodo para pesquisas no assumpto, e permittiu um grande numero de verificações interessantes. Assim, ZONDEK e ASCHHEIM (7) demonstraram a enorme eliminação de hormonio do lobo anterior durante a gravidez, ao lado do hormonio ovariano; é tão constante esse facto, que a pesquisa delle na urina constitue hoje o melhor e o mais precoce processo de diagnostico da gravidez, na especie humana. Facto digno de nota é que, alem do homem, só no chimpanzé elle foi verificado.

## PUBERDADE E ELIMINAÇÃO DE HORMONIOS HYPOPHYSIARIOS.

Na puberdade masculina o hormonio do lobo anterior pode ser encontrado na urina, como referem recentemente DE JONG, LAQUEUR e DINGEMANSE (8), em resumo.

Tambem verificamos esse facto na puberdade feminina; fizemos a pesquiza em 6 moçoilas, quando se iniciavam os primeiros symptomas menstruaes. Em 2, foi possivel demonstrar a existencia de hormonios prehypophysarios na urina, pela provocação da puberdade precoce nas camondongas infantis (pesando 6 a 7 grs.), injectadas. Ahi, os factos positivos

são decisivos, e os negativos não têm grande importancia, porque não se sabe qual o momento preciso em que se dá a eliminação; isso se poderá fazer facilmente, pela pesquiza systematica da urina, acompanhando as pacientes desde um praso mais ou menos longo, antecedente á puberdade.

## HYPOPHYSE E LEI DO "TUDO OU NADA".

PÉZARD (9) estabeleceu a lei do tudo ou nada, para o funccionamento endocrino do testiculo, nos gallinaceos. Elle demonstrou que acima de uma quantidade minima de testiculo, os animaes são normaes, no ponto de vista dos caracteres sexuaes. Abaixo desse minimo efficaz, o animal é igual a um castrado total. Não é possivel obter typos intermediarios, á custa de uma reducção da massa testicular. LIPSCHÜTZ e seus collaboboradores (10) demonstram que nas cobayas basta 1 % do peso normal de testiculo para manter o penis e glandulas annexas em nivel normal.

PEZARD estendeu aos ovarios a lei em questão; os novos conhecimentos sobre o hormonio ovariano trazem fortes restricções a isso; mas quanto ao testiculo, nenhum argumento de valor foi opposto. Todavia, as noções recentes sobre o papel do lobo anterior da hypophyse exijiam uma nova verificação da lei, principalmente quanto á possibilidade de provocar uma hyperfuncção testicular.

De facto, estabelecido um factor de regulação, comprehende-se muito bem que, com o enxerto de varios testiculos em animal normal, nada se obtenha de supra-normal, como verificou PEZARD. E ainda que a reducção de massa seja compensada por uma hyper-secreção, apezar de histologicamente, não serem encontrados no pequeno fragmento restante signaes seguros de hyper-funcção.

Actualmente, a lei do "tudo ou nada" poderia ser interpretada de trez modos:

1º—A hypophyse funcciona "tudo ou nada", isto é, ou não estimula, ou provoca no testiculo reacções maximaes.

2º—O testiculo só reage tudo ou nada, quer dizer, a partir de uma certa quantidade de hormonio hypophysario elle daria o maximo de effeito; ás concentrações maiores de hormonio hyp. elle seria indifferente.

3º—A lei do tudo ou nada reside nos orgãos receptores, isto é, crista dos gallinaceos, penis, glandulas annexas, etc., nos mammiferos.

Com as implantações da hypophyse ou injecção de material activo, podemos induzir no animal um estado de hyper-hypophysismo.

SMITH e ENGLE implantaram diariamente pituitaria anterior, por um periodo de 15 a 35 dias, em ratos adultos. Não houve augmento de peso nem alterações estructuraes na genitalia dos animaes em experiencia.

Nós fizemos 3 a 4 implantações de lobo anterior de hyp. de coelho em camondongos de 18—20 grs., durante um praso de 60 a 90 dias. Ao fim desse tempo, o tracto genital era examinado. Tomamos como guia as dimensões das vesiculas seminaes, e o peso dos testiculos. Em 4 animaes de 18—20 grs., as dimensões foram 14,5 $\times$ 5 mm. (comprimento e largura maximas); 15 $\times$ 5; 20 $\times$ 4,5; numeros que estão dentro dos limites normaes. O que nos chamamos "indice dimensional das vesiculas" (11), isto é, o producto L $\times$ H, seria, nos animaes acima, respectivamente 72,5, 75 e 90. Nos animaes normaes o indice varia de 60 a 115.

O peso dos testiculos não é superior ao normal. Injectamos então hormonio hypophysario extrahido da urina de mulheres gravidas, isento de hormonio ovariano e previamente verificado activo em animaes infantis. Ainda assim, nada de positivo pudemos obter, injectando 3 a 4 vezes por semana cerca de 5 a 10 unidades ZONDEK—ASCHHEIM, de cada vez; a experiencia foi feita em 4 cammondongos de 20 – 23 grs.

Histologicamente, não encontramos nada no testiculo que pudesse traduzir um super actividade. Apenas, em um caso de animal cryptorchidico, o testiculo abdominal apresentava uma hypertrophia intersticial que excedia muito a que se observa de regra nessa situação. Quer na nossa colleção de testiculos cryptorchidicos, quer nas microphotographias encontradas em trabalhos de diversos autores, nenhum apresenta tanta riqueza de elementos intersticiaes. E' um facto que merece elucidação posterior, tanto mais quanto no testiculo normalmente descido nenhuma reacção intersticial foi observada, nos animaes injectados ou implantados.

Em conclusão, com a technica descripta não foi possivel induzir nos orgãos sexuaes secundarias nenhum desenvolvimento acima do normal, que traduzisse uma hyperfuncção testicular.

Somente o emprego de um extracto testicular activo e sufficientemente puro para poder ser injectado em quantidades crescentes, resolverá a questão.

Quando se puder ter segurança de que realmente um animal com excesso de hormonios testiculares em circulação não ultrapassa a morphologia sexual normal, então será possivel determinar até que ponto vae a capacidade de reacção nos orgãos receptores.

## CASTRAÇÃO E HYPOPHYSE.

E' sabido que após a castração, a hypophyse se hypertrophia, e modificações histologicas se estabelecem no lobo anterior (FICHERA 12).

As hypophyses dos animaes castrados, implantadas em ratos infantis, mostram actividade maior que as retiradas de animaes normaes (ENGLE, 13, EVANS e SIMPSON 14).

Na ausencia das gonadas, portanto, ha um enriquecimento de hormonio na glandula. Esse facto poderia ser interpretado por um accumulo de hormonios, que não seriam secretados após a castração. Mas ha evidencias de que depois da ablação das gonadas elles circulam em quantidade dosavel.

MATSUYAMA (15) publicou ha annos um trabalho de grande valor e que não exerceu entretanto, grande influencia sobre a marcha das pesquisas em torno das glandulas sexuaes.

Elle uniu em parabiose ratos normaes e castrados. Pela união de ratos normaes do mesmo sexo, não ha modificações genitaes que nos interessem. Mas a ligação de um castrado com um normal tem consequencias da maior importancia. E' assim que a atrophia do utero, ou do penis e glandulas annexas do companheiro castrado não se modificam com a união a uma femea normal; mas a genitalia desta soffre modificações consideraveis. Os ovarios crescem enormemente; tornam-se cysticos, e depois ricamente luteinisados. O utero atinge proporções enormes; ha hypertrophia e hypersecreção, que o distende.

GOTO (16) repetiu e confirmou as experiencias de MATSUYAMA.

MATSUYAMA não deixa transparecer qual a interpretação desses phenomenos; GOTO admitte a existencia de um "Kastrhormon", substancia secretada só nos animaes castrados; com a injecção do sangue destes, provoca alterações genitaes em femeas normaes adultas.

Os conhecimentos actuaes permittem lançar um pouco de luz sobre esses phenomenos insolitos.

A interpretação mais simples e mais logica é a de que se trata do hormonio do lobo anterior da hypophyse, que passa do animal castrado para o animal normal, em parabiose.

KALLAS (17) uniu em parabiose ratos infantis; femeas castradas com femeas normaes. No fim de alguns dias, os ultimos entram em puberdade precoce, traduzida pela maturação do ovario, abertura da vagina e cio.

KALLAS é o primeiro autor que evidencia a possibilidade de ser identificada com o hormonio do lobo anterior a substancia circulante no castrado, o "Kastrhormon" de GOTO; e ainda vê na experiencia uma demonstração de que mesmo nos animaes infantis o hormonio do lobo anterior existe em circulação.

Estamos de accordo quanto á identidade entre a substancia em questão e o hormonio do lobo anterior. Discordamos, entretanto, que a experiencia prove que nos animaes infantis normaes os hormonios referidos já circulem.

Poder-se-ia julgar que, na ausencia dos ovarios, isto é, dos orgãos que normalmente fixam o hormonio hypophysario, esse ficasse livre na circulação e passasse do castrado para o normal. Mas no caso dos infantis, a concentração delles no sangue está evidentemente abaixo do limiar necessario á provocação da puberdade; e a pequena quantidade que passa de um para outro, torna difficil explicar a constancia dos effeitos, isto é, a puberdade num rato de 15 a 20 grs., quando normalmente ella só se dá em animaes pesando mais de 50 grs.

As injecções de sangue ou soro sanguineo por nós realisadas tambem demonstram a presença de hormonio hypophysario circulante nos castrados.

## PUBERDADE PRECOCE PELA INJEÇÃO DE SANGUE DE ANIMAL CASTRADO.

Ratos infantis machos e femeas foram castrados, com um peso de 25–30 grs. 8 dias após, o sangue retirado por puncção do coração era injectado em ratos infantis daquelle peso. A injecção 2 a 3 vezes por dia, de 0,20 a 0,3 de sangue ou de soro, provocaram no animal injectado a abertura da vagina e o estro, a partir do 5º dia. No ovario, encontram-se os folliculos desenvolvidos e, mais raramente, corpora lutea atresica. A injecção de sangue nas mesmas condições, retirado de animaes infantis normaes, não provoca esses phenomenos, mesmo injectando doses maiores.

---

Dir-se-a que nos animaes infantis ou adultos, os ovarios fixem o hormonio circulante. Mas o sangue retirado em dado momento do coração, não passou todo pelo ovario.

A interpretação que nos parece rasoavel é a de que na castração

haja uma hyperfuncção de hypophyse; as gonadas exercem uma influencia directa ou indirecta sobre a a pituitaria, existindo portanto entre as duas glandulas uma interrelação mutua.

Dos factos acima descriptos, podemos por em evidencia que, na castração, observa-se em relação á hypophyse: 1º Hypertrophia. 2º Enriquecimento da glandula em hormonios. 3º Existencia delles em circulação, em grande quantidade.

A gravidez nos primatas é ainda um exemplo de influencia da genitalia sobre a hypophyse; si não foi ainda determinado de onde parte o estimulo para a enorme descarga de hormonios que se observa nessa situação, é obvio que primariamente na genitalia elle deve estar localisado; e a partir de certo tempo, talvez na placenta.

Para decidir a questão do funccionamento precoce da hypophyse ou da sua hyperfuncção, após a castração, temos experiencias em curso, nas quaes a hypophyse de um ou de ambos os animaes em parabiose, foi retirada.

## O CYCLO ESTRAL DOS ANIMAES EM PARABIOSE.

Nas experiencias de MATSUYAMA e de GOTO, a atrophia do utero dos animaes castrados não se modificava quando elles eram unidos em parabiose, com animaes normaes. Pareceria, portanto, que o hormonio ovariano não passa de um para outro. Isso seria explicavel pela presença do utero, vagina ou outros fixadores eventuaes daquelle hormonio; desse modo o hormonio secretado nos ovarios seria todo elle consumido no organismo do animal normal.

Nós nos propuzemos a estudar o cyclo estral dos animaes em parabiose; para essa ultima questão, unimos uma femea castrada a uma normal, da qual retiramos completamente o utero.

Mas a experiencia demonstrou que essa ablação não era necessaria; o hormonio ovariano passa em qualquer caso, como se vê adiante.

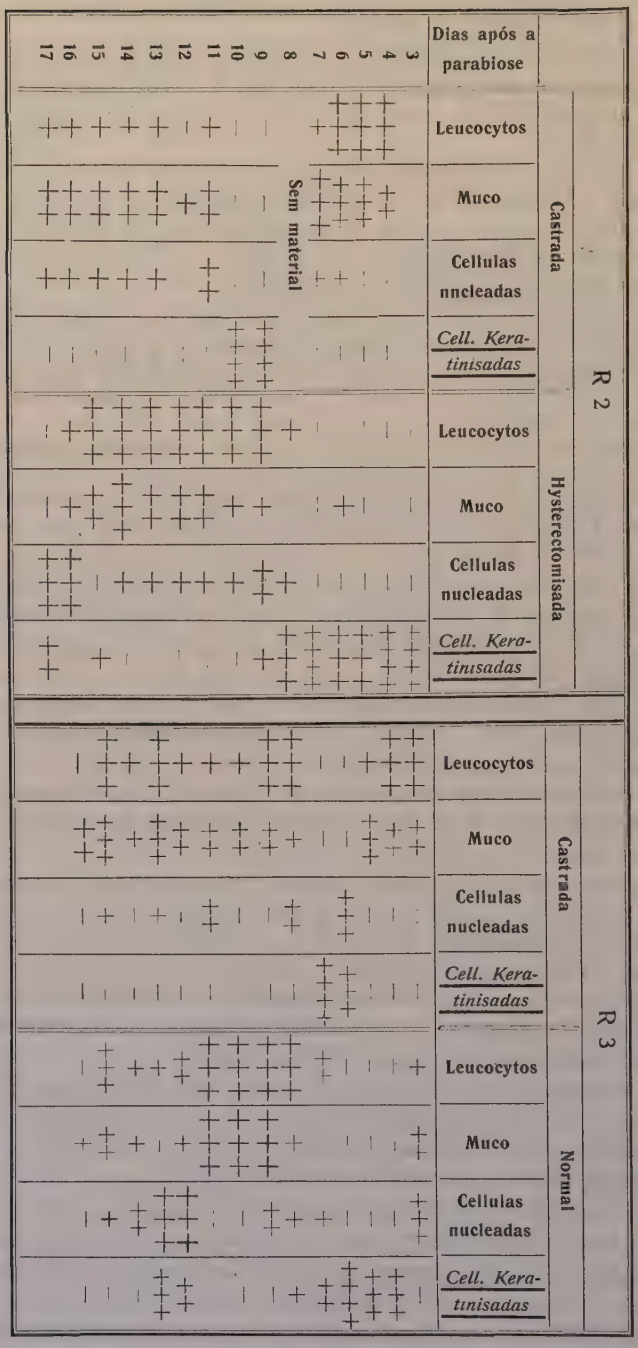
### EXPERIENCIAS

6 ratos brancos da mesma ninhada foram tomados para experiencia. Quando attinjiam um peso de 35 – 37 grs., 3 foram castradas. 25 dias após, foram feitas as parabioses. Os animaes pesavam 75—80 grs; as normaes já tinham manifestado alguns cyclos estraes, e as castradas permaneciam em diestro desde a castração. Usamos a technica de SAUERBRUCH-HEYDE, (18) cœlostomia. Abertas as cavidades abdominaes, suturavam-se os animaes em tres planos: peritoneo, musculo e pelle.

A cicatrisação se fez rapidamente e os animaes se conservaram harmonicamente, isto é, sem signaes exteriores que traduzissem anemia ou plethora de um delles. Foram conservados como controle uma normal e uma castrada, livres.

O conteudo vaginal era pesquizado diariamente, com a technica usual; quando havia duvidas sobre a modificação delle, repetia-se 2 a 3 vezes por dia. No quadro figura em cada dia, o que houve de mais caracteristico.

Pode-se lembrar resumidamente que o cyclo sexual dos ratos (LONG e EVANS, 19) pode ser estudado pelo exame do conteudo vaginal.


R 2
Castrada
Hysterectomisada
Leucocytos
Muco
Cellulas nucleadas
Cell. Keratinisadas
Leucocytos
Muco
Cellulas nucleadas
Cell. Keratinisadas
Sem material
Dias após a parabiose
3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
R 3
Castrada
Normal
Leucocytos
Muco
Cellulas nucleadas
Cell. Keratinisadas
Leucocytos
Muco
Cellulas nucleadas
Cell. Keratinisadas

| Dias | Controle normal | | | | Controle castrada | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Leucocytos | Muco | Cellulas nucleadas | Cell. Keratinisadas | Leucocytos | Muco | Cellulas nucleadas | Cell. Keratinisadas |
| 3 | +++ | ++ | — | — | +++ | ++ | — | — |
| 4 | +++ | + | ++ | - | ++ | + | | — |
| 5 | — | — | +++ | +++ | ++ | + | ++ | — |
| 6 | — | — | — | +++ | +++ | +++ | + | — |
| 7 | + | +++ | + | — | ++ | +++ | + | — |
| 8 | ++ | ++ | — | — | Sem material | | | |
| 9 | + | ++ | + | — | Sem material | | | |
| 10 | — | | — | +++ | + | +++ | | — |
| 11 | — | — | | +++ | No material | | | |
| 12 | +++ | ++ | ++ | — | + | +++ | - | - |
| 13 | + | + | — | + | — | + | — | — |
| 14 | + | + | ++ | - | + | ++ | + | - |
| 15 | — | — | - | +++ | Sem material | | | |
| 16 | — | — | — | +++ | + | ++ | + | - |
| 17 | + | + | + | — | Sem material | | | |

As variações da mucosa vaginal reflectem a phase do cyclo sexual em que se encontra o animal.

No rato ou no camondongo normal, as phases de actividade, ou estro, são traduzidas pela keratinisação da mucosa; um frottis do conteudo vaginal mostrará grande abundancia de cellulas eosinophilas sem nucleo coravel, e ausencia de leucocytos.

Durante o repouso ou diestro, o frottis mostra leucocytos, muco e eellulas nucleadas, em menor abundancia. A castrada vive invariavelmente em diestro; a introducção de hormonio ovariano, por injecção ou implantações provocará o estado do estro.

* * *

O par R2 é formado pela união de uma castrada com uma normal; dessa ultima, foi retirado completamente o utero. de accordo com o raciocinio desenvolvido atraz. R3 é constituido pela parabiose de uma castrada com uma normal. Os controles — normal e castrada — figuram ao lado.

Como se vê, da maneira a mais nitida, as femeas não castradas entram em estro prolongado, pouco depois da união com castrados. No par R2, esse estado de estro foi mantido durante 6 dias; em R3, elle durou cerca de 4 dias.

Facto novo e interessante, o animal castrado tambem manifestou signaes completos de estro, o que significa a passagem de hormonio ovariano proveniente do animal não castrado. Mesmo no animal R3 normal, em que não se fez nenhuma alteração operatoria dos orgãos genitaes, a passagem de hormonio ovariano para o castrado se fez amplamente. Portanto, o utero e demais receptores não foram obstaculo ao intercambio hormonal.

Um facto que merece assignalado, é a intensidade de keratinisação da mucosa vaginal. Tanto nas parabiosadas castradas como nas não castradas, a massa de cellulas keratinisadas enchia amplamente a vagina, em quantidade que nunca foi por nós observada nos animaes normaes isolados. Note-se é ainda o periodo latente para o estro na femea castrada; assim, em R2 o estro só se manifestou após a terminação do estro na companheira normal; em R3, elle appareceu quando a normal já estava no seu 3º dia.

Emfim, estas experiencias suggerem uma serie de problemas que continuamos a investigar; mas o que já podemos considerar definitiva é a noção da passagem do hormonio ovariano de um animal para outro, em parabiose.

Nesse genero de experiencias, mais do que em qualquer outro, a qualidade tem muito mais importancia do que a quantidade. Nenhuma objecção pode ser feita á serie acima. As femeas castradas o foram cuidadosamente; por occasião da operação de parabiose, examinamos os uteros e verificamos a sua atrophia completa. O estro duradouro dos animaes não castrados, nós o interpretamos pela passagem do hormonio pre-hypophysario, que circula em grande abundancia nos animaes castrados.

Posteriermente, publicaremos o estudo macro e microscopico da genitalia interna dos animaes.

## A QUESTÃO DA PLURALIDADE DOS HORMONIOS DO LOBO ANTERIOR.

Alem do hormonio ou hormonios da hypophyse anterior, que exercem um estimulo sobre as gonadas, EVANS e LONG (20) extrahiram do orgão substancias que exercem acção inhibidora sobre o estro das ratas.

Relativamente aos hormonios estimulantes que estudamos atraz, ha a assignalar, como effeitos os seguintes, nos animaes femeas, obtidos pelos varios autores citados:

1º Desenvolvimento dos folliculos ovarianos.
2º Formação de corpora lutea atresica.
3º Formação de corpora lutea, após ovulação.

Com a implantação de lobo anterior da hypophyse, os effeitos 1 e 3 predominaram. Pode-se, em determinados casos, provocar apenas o desenvolvimento dos folliculos, como é exemplo a figura 2.

Usando a urina de mulher gravida como fonte de material, encontra-se no camondongo, um aspecto macroscopico especial, que ZONDEK e ASCHHEIM denominaram "Blut punkte", isto é, pontos hemorrhagicos que se distinguem muito bem, a olho nú na superficie dos ovarios, e que são um elementos para seu bello processo de diagnostico da gravidez.

Com as implantações, nunca obtivemos "Blut punkte", donde concluimos que pelo menos elles não são frequentes como no caso da urina, o que tambem observou ENGLE (21).

A formação de corpora lutea atresica é a forma mais constante, quando se injecta urina. A reacção 1, de ZONDEK e ASCHHEIM, isto é, a maturação dos folliculos simplesmente, só raramente se observa com a injecção de urina.

C I C

Fig. 1—Puberdade precoce de camondongo infantil de 7,5 gr., aos lados dois controles. O animal foi implantado com 2 lobos anteriores de hypophyse de coelho. I—implantado. C—controles.

Fig. 1—Precocious sexual maturity, following 2 implantations of anterior pituitary of rabbit. I—7,5 gr. mous, implanted. C—Untreated controls.

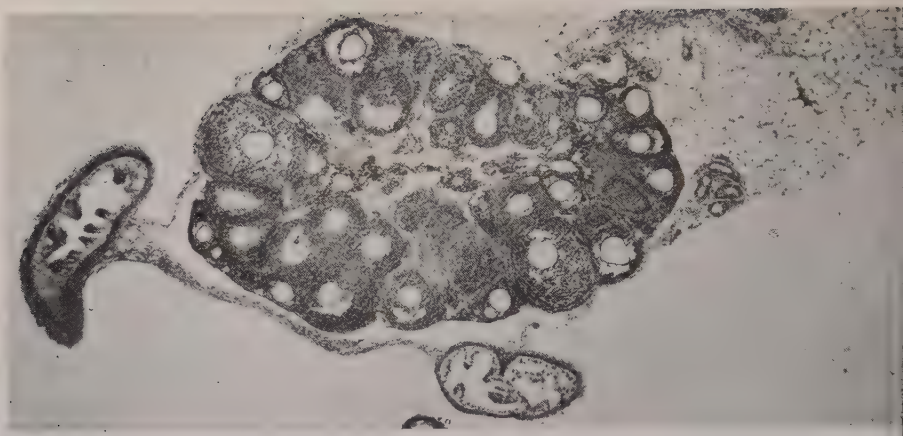


Fig. 2—Corte de ovario e trompa de um camondongo branco infantil de 7,5 grs.
Fig. 2—Cross sectiou of ovary and tuba of an 7,5 grs., immature mouse.
1 × 45.

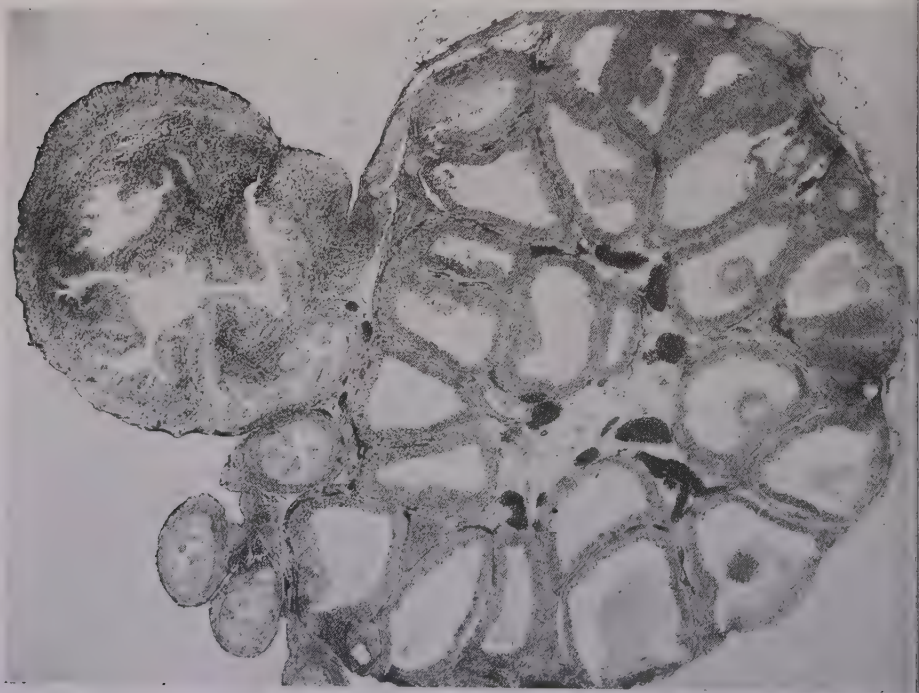


Fig. 3—Corte do ovario do animal implantado, visto na fig. 1.
Fig. 3—Cross section of the ovary, of implanted mouse shown in fig. 1.
1 × 45.

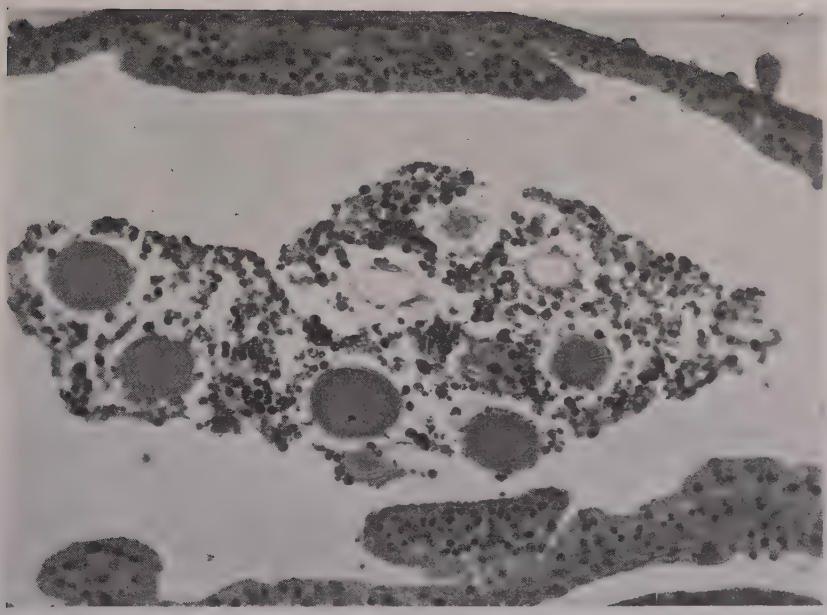


Fig. 4—Ovulos na trompa de um camondongo infantil de 7,5 grs., em puberdade precoce, 100 horas após a implantação de 1 lobo anterior de hypophyse de coelho.

Fig. 4—Tubal ova ; precocious sexual maturity, 100 hours after one single implantation of 1 anterior pituitary of rabbit, in a 7,5 grs. mous.

1 × 220.

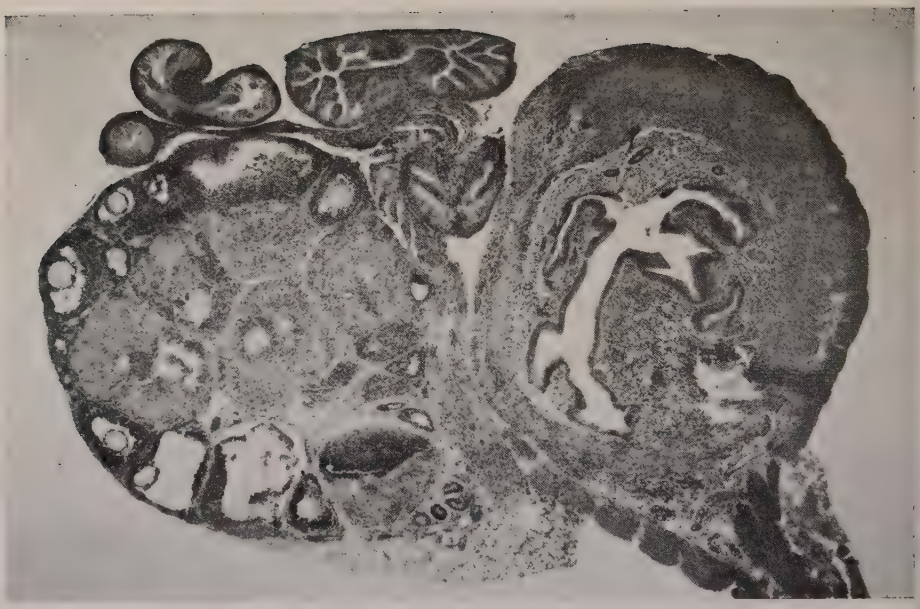


Fig. 5—Desenvolvimento dos folliculos, formação de corpora lutea atresica, folliculo hemorrhagico, após injecção de urina gravidica, dentro de um praso de 100 horas. Camondongo de 7 grs.

Fig. 5—Follicular development, corpora lutea atresica, hemorrhagic follicle, after injection of pregnant woman urine, in a 7 grs. mous. These changes are obtained within 100 hours 1 × 45.

C I

Fig. 6—Puberdade precoce provocada por 3 implantações de hypophyse anterior de coelho, em camondongo de 9 grs. Notar o desenvolvimento do penis e vesiculas seminaes. C—controle.

Fig. 6—Precocious sexual maturation, followiog 3 ant. hyp. of rabbit, implantations, in a 9 grs., male mous. Development of penis and seminal vesicles. C—control.

Nenhum argumento serio se pode invocar, para negar a identidade entre os hormonio hypophysarios eliminados na gravidez e os produzidos pela hypophyse.

Ha entretanto evidencias de variações quantitativas e qualitativas desses hormonios, conforme as situações physiologicas ou experimentaes.

Notadamente o factor atresiante domina na urina gravidica.

A elaboração de mais de um hormonio pelo lobo anterior é uma possibilidade perfeitamente rasoavel.

Até certo ponto, o antagonismo entre a ação estimulante do desenvolvimento follicular e a acção luteinisante, dão idea de um mechanismo muito bem adaptado para a regulação do cyclo ovarianno.

ASCHHEIM (22), recentemente, tende a admittir a pelo menos dualidade do hormonio, e assim tambem BRÜHL (23).

Do que observamos e pesquisamos, somos levados a concordar com esse ponto de vista; mas por emquanto nada podemos dizer de definitivo, e pensamos dar em breve conclusões mais seguras,

(Laboratorio de Physiologia do Instituto Oswaldo Cruz).

## BIBLIOGRAPHIA

Ver no final da traducção ingleza.

# Researches on the physiology of the anterior hypophysis and sexual glands

By THALES MARTINS, M. D.

(Assistent of the Oswaldo Cruz Institute).

The recent works of ZONDEK and ASCHHEIM (1), SMITH and ENGLE (2) established with full certainty the part played by the anterior lobe of the hypophysis as a regulator for sexual glands. It is a well known fact that the implantations of the anterior lobe of the pituitary body or the injection of certain extracts, induces in male or female immature animals precocious puberty to appear.

The sex, species or age of the donnor plays no rôle qualitatively, at least amongst mammals. The hypophysis of fowl do not give full results (SMITH and ENGLE, 2); LIPSCHÜTZ, KALLAS and WILKENS (3a) neither also those of Chilian frogs (kalyptocephalus) during the sexual stillness (LIPSCHÜTZ and PAEZ (3b) or even in the period of sexual activity (TH. MARTINS, 4) in brazilian frogs (Leptodactyllus). In the whole set of the above mentioned works, it is merely dealt with implantations effected on infantile rodents. However, HOUSSAY and GONZALEZ (5) observed testicular hypertrophy in normal or hypophyseoprived toads, after implantations of hypophysis of toad.

We may consider the stimulating rôle of the prehypophysis as general in mammals; similar results have been obtained in the most varied zoological groups, even in primates (ALLEN, 6).

The readiness and certainty of reaction of the ovaries in small rodents, in presence of the prepituitary, makes these a practical test material for researches of the kind, and has enabled to get a great number of most interesting verifications. In fact, ZONDEK and ASCHHEIM (7) could demostrate the enormous elimination of hormones from the anterior lobe during pregnancy, together with the ovarian hormone; and this fact is constant to such an extent, that its finding in urine constitutes nowadays the best process for an early diagnosis of pregnancy.

A noteworthy fact is that, besides man, it could be verified only in the chimpanzee.

## HUMAN PUBERTY AND ELIMINATION OF HYPOPHYSEAL HORMONES.

During masculine puberty, in men, it may be found in urine, as reported recently by DE JONG, LAQUEUR and DINGEMANSE (8) in a summary.

We may confirm te fact, in feminine puberty. We carried out our research in 6 young girls, when the first menstrual symptoms were beginning to appear. In two of them, it was possible to demonstate the existence of prehypophyseal hormones in urine, by determining precocious puberty, when

injected in infantile mice (weighing from 6 to 7 gr.). In this case, positive results are decisive, whereas the negative are of no importance, since the exact moment is not known, when the elimination takes place; this may also be easily effected by systemic examination of urine, observing patients for a longer or smaller delay foregoing to the appearance of puberty.

## HYPOPHYSIS AND THE "ALL OR NOTHING" LAW.

PEZARD (9) established the law of "all or nothing" for the endocrine function of testicles in fowl. He demonstrated that above a certain minimum quantity of testicle, animals are normal as regards sexual characters. Below such efficient minimum, the animal is equal to a totally castrated one. Intermediate types are not obtainable by a reduction of the testicular mass.

LIPSCHÜTZ and his co-workers (10) demonstrated that, in Guinea pigs, 1 o/o of the normal weight of testicles is sufficient to keep the penis and accessory glands at a normal level.

PEZARD extended to ovaries the law referred to; recent knowledge about ovarian hormone bring serious objections and reserves hereagainst; however, with regard to testicle, no available argument has been opposed.

In any case, the recent notions about the role of the anterior lobe, require a new verification of the law, specially with reference to the possibility of determining testicular hyper-function.

In fact, a factor of regulation being established, one understands easily that, by grafting several testicles on a normal animal, nothing supra normal is obtainable, as verified by PEZARD, and even, if the reduction of the mass is compensated by an hyper-secretion, in spite of unquestionable signs of hyper-function in the small remaining fragment not being found.

Under present circumstances, the law of "all or nothing" might be explained in the three following ways:

1o) The hypophysis acts in "all or nothing" that is to say, either does not stimulate, or determines in the testicle maximal reactions;

2o) The testicle reacts in "all or nothing", this meaning that, under the condition of existing a certain determined quantity of hypophyseal hormone, it will react to a maximum effect; it would remain indifferent to higher concentrations of hypophyseal hormone.

3o) The effector organs, (cock's comb, penis and glands of mammals) react "all or nothing'. Above a certain concentration of testicular hormones, they are indifferent.

By means of pituitary implantations or injection of active material, we can induce in the animal a condition of hyper-hypophysism.

SMITH and ENGLE implanted daily anterior pituitary bodies for a period of 15 to 35 days on adult rats. No increase of the weight nor changes in the structure of the genitalia of the animals were observed.

We effected 3 or 4 implantations or anterior lobe of rabbit hypophysis, on mice weighing 18 to 20 grams, during a period from 60 to 90 days, after which time the genital tract was examined. Our test was the size of the seminal vesicles and the weight of testicles. In 4 animals

weighing 18–20 grams, the size was 14,5 × 5 mm. (maximum length and width); 15 × 5; 20 × 4,5; numbers that remain within the normal limits. What we quote as "size index of vesicles" (11), the product of L × H, would in the above mentioned animals, respectively 72,5, 75 and 90. In normal animals, this index varies between 60 and 115.

The weight of the testis is not superior to the normal. We then injected hypophyseal hormones extracted from the urine of pregnant women, quite free from ovarian hormone and previously proved active for infantile animals. Even in this way, we were unable to obtain positive results, injecting three or four times a week about 5 to 10 ZONDEK–ASCHHEIM units every time. The experiment was effected in 3 mice weighing 20–23 grams.

We could not find histologically anything in the testicles that may demonstrate super-activity; but in one case of a cryptorchidic animal, the abdominal testicle developed an intersticial hypertrophy which was far above that usually observed in such condition. Either in our own collection of cryptorchidic testes, or in microphotographs found in works of various authors, none did show such plenty of interstitial elements. This is a fact which deserves further study, specially because, in the normally descended testicle, no intersticial reaction had been observed in animals, either implanted or injected.

To conclude, the technique as described did not enable us to induce in secundary sex organs, any development supranormal, that would account for a testicular hyper-function.

The question may be solved only by using a testis extract, perfectly active and sufficiently pure to be injected in increased quantities.

When a certainty may be got at, that an animal with an excess of testicular hormone in the circulation does mot react above the normal sexual morphology, as a "supermale", then it will be possible to determine the limits of reaction of the receptor organs.

## CASTRATION AND HYPOPHYSIS.

It is known that after castration, the hypophysis becomes hypertrophied, and histological changes take place in the anterior lobe (FICHERA 12).

The hypophysis of castrated animals, when implanted on infantile, immature rats, show a greater activity than those from normal donnors (ENGLE, 13, EVANS and SIMPSON, 14).

In the absence of the gonads, thus, an increase of the hormones takes place in the gland. This fact might be explained by an accumulation of hormones, which should be secreted after the castratiou. But there are experimental evidences, that after removal of the gonads, they circulate in blood in detectable quantities.

MATSUYAMA (15) published years ago, a most valuable work, which, however, did not cause a great influence on the sequence of researches about sexual glands.

He joined in parabiosis, normal and castrated rats. The union of normal rats of the same sex does not involve any interesting genital change. But joining a castrated with a normal brings most important consequences.

And, in fact, the atrophy of the uterus, or of the penis and glands of the castrated specimen do not undergo any change by joining it with a normal female; but the genitalia of this latter suffer very serious changes. The ovaries grow considerably; they become cystic, and afterwards, richly luteinized. The uterus reaches enormous proportions. There is an hypertrophy and hyper-secretion which causes its distension.

GOTO (16) repeated and confirmed MATSUYAMA's experiments.

MATSUYAMA gave no explanation for these phenomena; GOTO admits the existence of "Kastrohormone", a substance secreted by castrated animals only; he injected blood of castrated rats in normal adult females, and observed genital alterations.

The present knowledge of the anterior pituitary enables us to throw some light upon such strange phenomena.

A most simple and logical explanation would be to assume that the circulating anterior lobe hormones are transferred from the castrated to the normal animal in parabiosis.

K ALLAS (17) coupled in parabiosis infantile rats; castrated with normal females. After a few days, the latter arrive to eaarly pyberty, which is marked by maturation of the ovary, opening of the introitus and estrus.

KALLAS is the first author who alludes to the possibility of identifying with the hormone of the anterior lobe, the substance that circulates in the castrated rat, the so-called "kastrohormone" of GOTO; he sees besides as demonstrated in this experiment, that even in infantile animals, the hormone of the anterior lobe exists in circulation.

To this, we quite agree, inasmuch the identity of the said substance and the hormone of the anterior lobe is concerned. We object however, against the assertion of this experiment, proving that in young normal animals the said hormones are found really circulating.

One might suppose that, in the absence of the ovaries, that is to say, of the organs which normally retain the hypophyseal hormone, this would remain free accumulated in the circulation and could pass from the castrated to the normal animal in parabiosis. But in the case of the young specimens, its concentration in the blood is obviously below the limit that is necessary to determine the condition of puberty; and the small quantity that passes from one to the other, makes it uneasy to account for the constancy of effects, that is to say, the appearance of puberty in a rat weighing 15 to 20 grams, when normally it can appear only in an animal with a weight above 50 grams.

Injections of blood or blood serum also demonstrate the presence of hypophyseal hormones circulating in castrated infantile rats, in our cxperiments, as follows.

## PRECOCIOUS SEXUAL MATURITY DUCED IN BY INJECTIONS OF THE BLOOD OF CASTRATED INFANTILE RATS.

Immature male and female albino rats were castrated, when weighing 25 – 30 grams. Eight days later, the blood, extracted by punction from the heart, was injected to infantile 25—30 grs. rats. The injection, made 2 or 3 times dayly, of 0,20 to 0,3 c.c. of blood or serum, induced in the injected animals the opening of the introitus and the estrus after

five days. In the ovary, the follicles are seen depeloped, and more seldom, there appears corpora lutea atresica. The injection of blood under the same conditions when extracted from infantile normal animals, does not induce these phenomena, even injecting higher dosis.

One might say that in infantile or adult animals, the ovaries retain the circulating hormone. But the blood extracted from the heart at a certain moment, did not pass entirely through the ovary.

An explanation which seems to us the most reasonable, is that in the castration, there may be an hyper-function or an precocious function of the hypophysis; the gonads exert an influence either direct or indirect on the pituitary body, thus existing consequently some mutual correlation between both glands.

From the above described facts, we may draw the conclusion that, after castration, the followlng effects are observed concerning the hypophysis; 1º) hypertrophy; 2º) increased hormones contents; 3º) these hormones circulate in notable amount in blood.

Pregnancy in primates is still an exemple of the influence of genitalia toward hypophysis; if it has not yet been possible to determine from where does start the stimulus for the huge discharge of hormones, as observed in such situation, it is obvious that, they should be at first located in the genitalia, and at certain moment, possibly also in placenta.

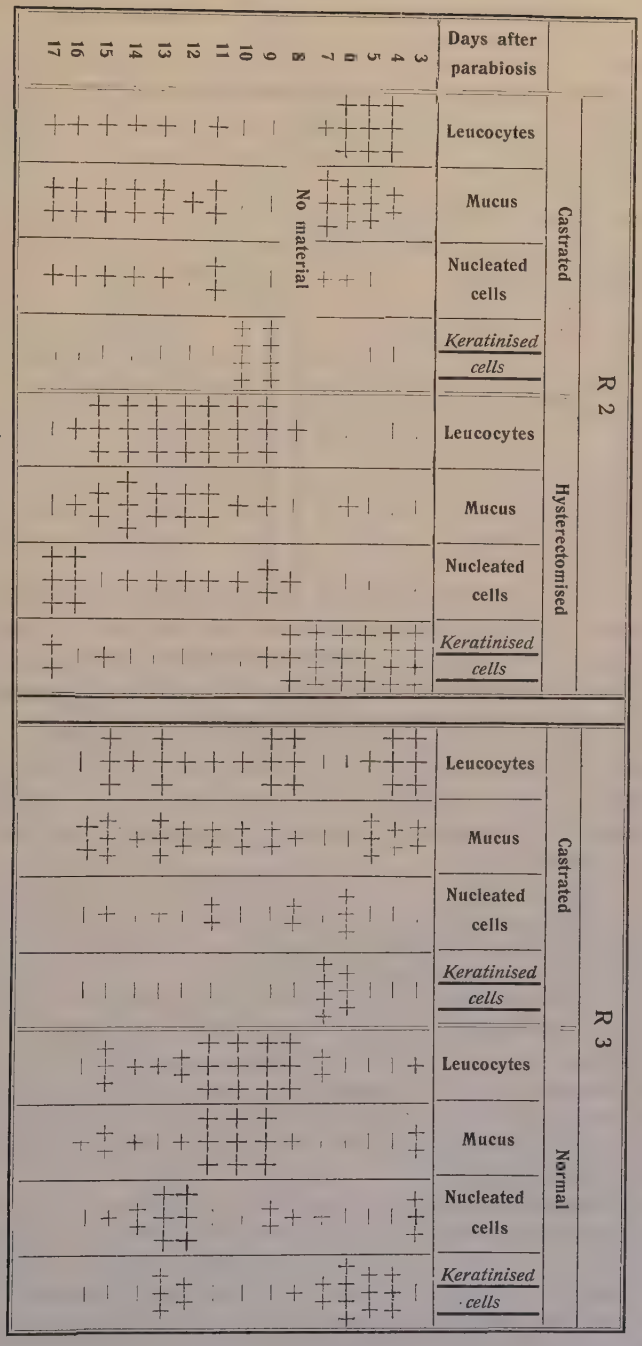
To afford a solution for the question, of early secretion or hyperfunction of anterior lobe after castration, we have some experiments in course, in which, the hypophysis of one or both of the animals in parabiosis has been removed.

## THE ESTROUS CYCLE OF THE ALBINO RATS IN PARABIOSIS.

In MATSUYAMA and GOTTO's experiments, the atrophy of the uterus of the castrated animals undergoes no change when joined in parabiosis with normal animals. It would seem that the ovarian hormone does not pass from the normal to the castrated animal. This could be accounted for the presence of the uterus, vagina or other fixators organs in the body of the non castratad companion; in this way, the hormone secreted in the ovaries would all be absorbed by the organism of the normal animal. We had in view studying the estrous cycle of animals in parabiosis; to solve this last question, we coupled a castrated female to a normal female, whose uterus had been completely removed. But the experiment proved that this ablation was by no means necessary; the ovarian hormone passes in every case, as follows.

### EXPERIMENTS

6 immature rats of the same litter were taken for experiments. When they attained to a weight of 35—37 grams, three of them were castrated. 25 days later, the parabiosis were effected, the weights were then 75—80 grs., the normal had previously demonstrated estrus cycles and the castrated were in diestrus. We undertook these in accordance with SAUERBRUCH-HEYDE's (18) technique: coelostomia. The abdominal cavities being opened, we sewed together the animals in three planes: peritoneum, muscle and skin. Cicatrization occured quickly and the animals lived harmonically that is, without any exterior sign that would point out anemia or plethora in any one of them. One normal and one castrated were kept free as controls.


R 2
Castrated
Hysterectomised
R 3
Castrated
Normal
Days after parabiosis
3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
Leucocytes
Mucus
Nucleated cells
Keratinised cells
No material

| Days | Normal control | | | | Castrated control | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Leucocytes | Mucus | Nucleated cells | Keratinised cells | Leucocytes | Mucus | Nucleated cells | Keratinised cells |
| 3 | +++ | ++ | — | — | +++ | ++ | — | — |
| 4 | +++ | + | ++ | — | ++ | + | — | — |
| 5 | — | — | +++ | +++ | ++ | + | ++ | |
| 6 | — | — | — | +++ | +++ | +++ | + | |
| 7 | + | +++ | + | — | ++ | +++ | + | — |
| 8 | ++ | ++ | — | — | No material | | | |
| 9 | + | ++ | + | — | No material | | | |
| 10 | — | — | — | +++ | + | +++ | — | |
| 11 | — | — | — | +++ | No material | | | |
| 12 | +++ | ++ | ++ | — | + | +++ | — | — |
| 13 | + | + | — | + | — | + | — | — |
| 14 | + | + | ++ | — | + | ++ | + | — |
| 15 | — | — | — | +++ | No material | | | |
| 16 | — | — | — | +++ | + | ++ | + | — |
| 17 | + | + | + | — | No material | | | |

The estrus cycle (LONG and EVANS, 19) was verified every day, in the usual way; when any doubt would prevail about its changes, the test was repeated 2 and even 3 times a day. In the table, there may be seeu day by day all the most characteristical appearances.

The couple R2 is formed by junction of a castrated to a normal rat; the latter's uterus was removed completely, in accordance with the reasoning already described. R3 represents the parabiosis example of a castrated together with a normal. The controls — normal and castrated — are stated aside in the table.

As is plainly seen, the non-castrated females enter into estrus, for a rather long time, little time after being joined with the castrated. In the couple R2, this stage of estrus could be kept up for a period of 6 days; R3 showed the same condition during 4 days.

But, a new and very interesting fact could be observed: the castrated also showed full signs of estrus, which proves the passage to it of ovarian hormone proceeding from the non-castrated companion. Even in the normal animal R3, which suffered no surgical change in its genital organs, the passage of ovarian hormone into the castrated effected itself richly. The uterus and other receptors were consequently no obstacle to the hormoneal interchange.

A fact worth of mentioning, is the intensity of the keratinization of the vaginal mucosa. As well in the parabiosed castrated as in the non castrated rats, the mass of keratimized cells filled plentifully the vagina, to such an extent as we never observed in isolated normal animals. We must note the latent period for the estrus in the castrated female; thus in R2, the estrus appeared only after it had ended in its normal companion; in R3, it appeared when the normal part was in its third day of estrus.

As a matter of fact, these experiments open the way to a number of problems which we go on trying to elucidate; still, we may consider as surely demonstrated the passage of the ovarian hormone from one animal to another in parabiosis.

In this kind of experiments, more than in any other, quality plays a more important part than quantity. No objection seems to be possible in respect of the above series. The castrated females were operated with the utmost caution; during the parabiosis operation, we took special care in examining the uterus of each rat and we are sure of its complete atrophy. The prolongated estrus of the non castrated animals is explained by the passage of the prehypophiseal hormone, which is found circulating in large quantity in the castrated animals.

We shall publish later the macro and microscopical study of the internal genitalia of the animals.

## ON THE QUESTION OF THE PLURALITY OF HORMONES OF THE ANTERIOR LOBE.

Beside the hormones of the anterior hypophysis, which have a stimulating influence on the gonads, EVANS and LONG (20) extracted from the organ, substances which cause an inhibiting action on sexual estrus cycle.

In reference to the stimulating hormones, which we described before, we must point out in female animals the following effects, which were verified by the various authors we quoted:

1°) Development of ovarian follicles.
2°) Formation of corpora lutea atresica.
3°) Formation of corpora lutea, following maturation and rupture of the follicle.

When grafting the anterior lobe of the hypophisis, the effects stated in 1° and 3° prevail. In some determined cases, it is possible to induce only the development of follicles, an example of which we have in fig. 2.

When using as material the urine of a pregnant woman, it is found in the mouse, a special macroscopical aspect, which ZONDEK and ASCHHEIM have specified as "Blutpunkte" or hemorrhagic points, and which are plainly seen with the naked eye, on the surface of the ovaries. These are one of the elements in their most interesting process of diagnosis for pregnancy.

With implantations, we never obtained "Blutpunkte" from which we draw the conclusion that they, at least, are not so frequent as in the case where urine is used, as it was also observed by ENGLE, (21).

The formation of corpora lutea atresica is the most constant type, when injecting urine. The reaction n. 1, of ZONDEK and ASCHHEIM, that is to say, merely the maturation of follicles, is rarely observed when injecting pregnant women's urine.

No argument can earnestly be opposed, that would attempt to deny the identity between the hypophyseal hormones eliminated during pregancy and those produced by the hypophysis.

There are, however, evidences of quantitative and qualitative variations of these hormones, depending upon situations either physiological or experimental.

More particularly, the factor of atresia is the one that prevails in the urine of pregnant woman.

The elaboration of more than one hormone by the anterior lobe appears as a perfectly reasonable possibility.

Up to a certain point, the antagonism between stimulating action of the follicular development, and luteinizing action, suggests the idea of a mechanism perfectly adaptated to the regulation of the ovarian cycle.

Recently, ASCHHEIM, (22) tended to assume at least the duality of the hormones, as also BRÜHL (23).

Our own observations and researches, induce us to accept this point of view; however, at the present time, we are still unable to say anything sure, but we hope to be shortly in a position to express more ascertained conclusions.

(Laboratory of Physiology, Oswaldo Cruz Institute)

## BIBLIOGRAPHY

(1)—ZONDEK and ASCHHEIM—Deutsch. Med. Woch., 52, 343, 1926.
Zeits. f. Geburtsh. u. gyn., 90, 372, 387, 1927.
(2)—SMITH—Proc. exp. soc. biol. a. Med., 24, 131, 1926.
SMITH and ENGLE—Am. J. of Anat., 40, 159, 1927.
(3a)—LIPSCHÜTZ, and WILKENS—C. rend. Soc. Biol., 100, 28, 1929.
b) LIPSCHÜTZ and PAEZ—C. rend. Soc. Biol., 99, 693, 1928.
(4)—MARTINS, TH.—C. rend. Soc. Biol.,101, 957, 1929.
(5)—HOUSSAY and GONZALES—Rev. de la Soc. Argent. de Biol., 5, 77, 1929.
(6)—ALLEN—Anat. rec., 29, 315, 1928.
(7)—ZONDEK and ASCHHEIM—Klin. Woch., 7, 831, 1928.
(8)—DE JONG, LAQUEUR and DINGEMANSE—Arch. Neerl. de Physiol., 14, 276, 1929.
(9)—PEZARD—J. Phys. et Path. Gen., 20, 700, 1922.
(10)—LIPSCHÜTZ, OTTOW and WAGNER—Pflügers Arch., 188, 76, 1921.
(11)—MARTINS, TH. and ROCHA e SILVA—C. rend. Soc. Biol. (Soc. bresil. de biol., seance 31-7-1929.
Instituto Oswaldo Cruz, Supplemento, pg. 196, 1929.
(12)—FICHERA—Arch. ital. Biol., 43, 405, 1905.
(13)—ENGLE—Am. J. Phys., 88, 101, 1929.
(14)—EVANS und SIMPSON—Am. J. Phys., 89, 371, 1929.
(15)—MATSUYAMA—Frank. Zeits. f. Path., 25, 436, 1921.
(16)—GOTO—Arch. f. exp. Path. u. Pharm., 94, 124, 1922.
(17)—KALLAS—C. rend. Soc. Biol., 100, 979, 1929.
(18)—SAUERBRUCH and HEYDE—Münch. Med. Woch., pg. 153, 1908.
(19)—LONG aud EVANS—Anat. rec., 18, 241, 1920.
(20)—EVANS and LONG - Anat. rec., 21, 62, 1921.
(21)—ENGLE—J. Am. Med. Ass., 93, 276, 1929.
(22)—ASCHHEIM—Klin. Woch., 8, 425, 1929.
(23)—BRÜHL—Deut. Med. Woch., 55, 696, 1929.

# Sobre o poder infectante da hæmolympha de mosquitos contaminados com o virus da febre amarella

Pelos Drs. H. de BEAUREPAIRE ARAGÃO e A. da COSTA LIMA

A observação dos differentes autores que estudaram a febre amarella indica que existe um certo intervallo entre a penetração do virus no mosquito é o momento em que esses insectos se tornam capazes de transmitil-o ao homem ou ao *M. rhesus*.

Esse periodo parece ser aquelle necessario para que o virus, que penetra no tubo digestivo do insecto, passe á cavidade coelomica e dahi ás glandulas salivares. Assim sendo poder-se-ia admittir que a hæmolympha tambem deve ser infectante.

Experiencias recentes de HINDLE (1) pareciam contrariar tal hypothese, pois esse autor, inoculando num *rhesus* pernas de 2 mosquitos infectados e noutro os corpos dos mesmos insectos, verificou que o primeiro macaco permanecia indemne ao passo que o ultimo succumbia a uma infecção typica. Dessa experiencia concluiu HINDLE "The results of this experiment indicate that the virus may be present in the organs of infected mosquitoes without necessarily invading the coelomic fluid".

Estudando o mesmo assumpto chegámos a resultado completamente diverso do de HINDLE, parecendo-nos que alguma causa de erro houve em suas experiencias e que tambem as pernas desses mosquitos não se achavam contaminadas por fezes. Nossas experiencias são as seguintes:

EXPERIENCIA 1. *M. rhesus* nº. 429 (21-5-29). Inoculado com uma emulsão de pernas de 10 mosquitos (6 infectados 33 dias antes do *rhesus* nº. 373 e 4 infectados 15 dias antes do *rhesus* nº. 405). Todos estes mosquitos tinham expellido gotticulas de fezes nos tubos em que se achavam e sobre os quaes tinham andado e assim seguramente haviam contaminado as pernas nasse material. Temperatura do macaco 38º,7 no momento de inoculação.

Nos primeiros dias a temperatura foi normal; no 8º dia subiu a 40º, sendo o sangue inoculado no *rhesus* nº. 444. Nos dias seguintes a temperatura foi de 39º e 39º,5. Em 1º de Junho o macaco apresentou 40º e no dia seguinte 39º,7. No dia 4 elle foi encontrado morto na gaiola. Apresentava na autopsia lesões typicas, confirmadas pelo exame histo-pathologico do figado, que demonstrou: necrose tão extensa das celiulas hepaticas que era quasi impossivel encontrar algumas intactas. Desarranjo das traves de HENLE, congestão e inclusões nucleares.

EXPERIENCIA 2. *M. rhesus* nº. 444 (29-5-29). Inoculado com 0,5 cc. de sangue do *rhesus* nº. 429. Temp. 39º. Durante 3 dias nenhuma alteração. Em 2 de Junho o macaco apresenta 39º,8, no dia seguinte 40º,2 e nos

(1) HINDLE, E. An experimental study of yellow fever. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 1929, XXII, 5, 417.

dias 4 e 5 a temperatura foi de 39º,8 e 39º,7. A 6 o macaco apresenta hypothermia. Foi sacrificado e na necropsia observámos lesões macroscopicas de febre amarella e tambem exame positivo do figado. Necrose, inclusões nucleares e congestão (TORRES).

Com o fim de verificar se a hæmolympha de mosquitos infectados contem de facto o virus achamos melhor colhel-a directamente no seio pericardico com a seguinte technica. Alimentavamos o mosquito com sangue e em seguida o anesthesiavamos com um pouco de ether. Uma vez conseguida a anesthesia, tomavamos o mosquito e o immobilisavamos fazendo-o adherir, pela face ventral, a um pequeno fragmento do esparadrapo preso a uma cortiça, que servia de mesa operatoria. Para fazermos a puncção collocavamos o supporte debaixo do microscopio binocular (occ. 4 e object. $a_3$—ZEISS). O ponto a ser punccionado, o espaço membranoso entre os 4º e 5º urotergitos (Figs. 1 e 2) era então esterelisado por cauterisação com um pequeno estylete de vidro aquecido. Para a puncção usavamos pipetas capillares de vidro, estereis (Fig. 3), que funccionavam perfeitamente, podendo-se com ellas retirar o liquido da cavidade pericardica do mosquito. A hæmolympha entra na pipeta mal esta penetra nessa cavidade. Si por accaso o estomago era perfurado durante a manobra para colher a hæmolympha, via-se-o immediatamente penetrar na pipeta e esta não era aproveitada na experiencia. As pontas das pipetas cheias de hæmolympha eram introduzidas em pequenos entalhes feitos na pelle do macaco com uma lamina Gillette.

Assim inoculámos o macaco por via intradermica com diversas dessas pipetas na experiencia que abaixo passamos a resumir.

EXPERIENCIA 3. *M. rhesus* nº. 501 (20-7-29). Inoculado com a hæmolympha de 8 mosquitos previamente alimentados com sangue de 3 macacos infectados. Nos 4 dias seguintes a temperatura manteve-se normal. No dia 25 de Julho se elevou a 40º,3, no dia seguinte subiu a 40º,7 e no dia 27 o macaco apresentava 37º pela manhã, vindo a morrer á tarde.

As lesões macroscopicas eram typicas e o exame histopathologico, feito pelo Dr. TORRES, revelou no figado lesões absolutamente typicas de febre emarella. Nós tambem procurámos provar que os mosquitos usados nesta experiencia estavam seguramente infectados, inoculando um *rhesus* (502) com uma emulsão desses insectos. Este macaco veio a morrer depois de ter apresentado febre no dia 27 com lesões macro e microscopicas absolutamente typicas de febre amarella.

Fig. 1

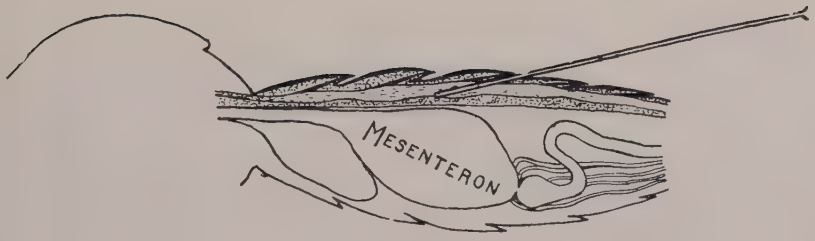



Fig. 2

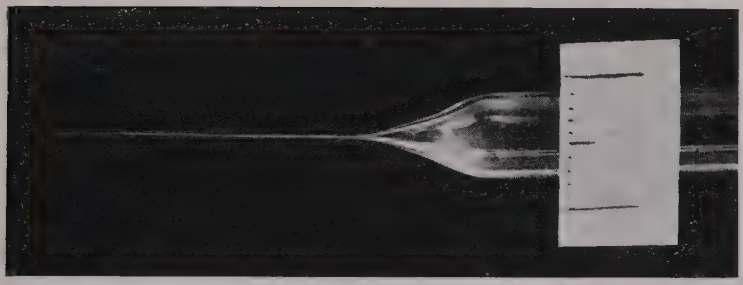


Fig. 3

Figs. 1 e 2. Schemas para mostrar os pontos preferidos na puncção do seio pericardico e como esta é realisada.

Fig. 3. Micropipeta usada na puncção do seio pericardico dos mosquitos (um pouco augmentada).

Figs. 1 and 2. Schemes for showing the best places to reach the pericardial chamber and how it is punctioned.

Fig. 3. Capillary pipette employed for punctioning the pericardial chamber of mosquitoes.

# On the contamination of hæmolymph in mosquitoes infected by the yellow fever virus

By Dr. H. de BEAUREPAIRE ARAGÃO and Dr. A. da COSTA LIMA

The observations of all the authors who studied yellow-fever transmission seem to indicate that after the virus has been taken into the mosquito's intestinal tract, a certain number of days must elapse before the insect is able to transmit it by its bites to man or to *M. rhesus.*

This period might well be explained as representing the time required for the germ to pass from the mosquito stomach to the coelomic cavity and hence, carried by means of the hæmolymph, to the salivary glands.

It follows from this hypothesis that the virus should be found in the coelomic fluid or, in other words, that this fluid should also be capable of infecting a monkey.

This hypothesis therefore was recently opposed by a very interesting experiment of HINDLE (1). He inoculated two monkeys, one with the legs containing hæmolymph of two mosquitoes infected sixty four days previously, and the other with the rest of the body. This monkey died of yellow fever four-and-a-half days later, whilst the first was not infected. 'The results of this experiment indicate that the virus may be present in the organs of infected mosquitoes without necessarily invading the coelomic fluid" (HINDLE).

Nevertheless, the experimental criterium adopted by HINDLE for reaching such a conclusion does not hold good after the results we obtained with mosquito's excreta. It might have failed if the experiment had given a countrary result and induced him to conclude to the infectious nature of the hæmolymph. We believe that the legs of the 2 mosquitoes used by HINDLE were not contaminated by excreta at the moment of the experiments.

We may draw this conclusion after having repeated his experiment but with legs of mosquitoes contaminated by excreta a few moments before the inoculation.

EXPERIMENT 1. *M. rhesus* nº. 429. This monkey received, on May 21, subcutaneously a few cc. of an emulsion of legs of infected mosquitoes in sterilized water. We used 10 mosquitoes, 6 contaminated on *rhesus* nº. 373, 33 days previously and 4 that had been fed on infected *rhesus* nº. 405, 15 days before. All these mosquitoes had expelled many droplets of excreta on the wall of the tubes and walked freely on these contaminated material.

After having etherized them, we take off their legs and prepared an emulsion.

---

(1) HINDLE, E. An experimental study of yellow fever. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 1929, XXII, 5, 417.

Temperature of inoculated *rhesus*: 38°7.

On the first days the temperature was normal. On the 29th, 8 days after the inoculation, it rose in the afternoon to 40°. The monkey then was bled and its blood injected into *rhesus* nº. 444. On the 2 following days the temperature fell to 39° and to 39°.5. On June 1, a new rise to 40°, falling the next day to 39°.7. On June 4 we found the monkey dead in its cage. The autopsy and the histo-pathological examination of the liver showed typical lesions of yellow fever. The result of this last examination was given by TORRES in the following terms: "Necrosis of the liver cells so extensive that it was almost impossible to observe normal ones. Disarrangement of the columns of hepatic cells. Congestion. Nuclear inclusions".

EXPERIMENT 2. *M. rhesus* nº. 444. Inoculated on May 29th with 0.5 cc. of blood withdrawn from *rhesus* nº. 429. Temp. 39°. On the 3 following days after the inoculation the temperature remained normal. On June 2 rose to 39°.8. On June 3, 40° 2, on June 4, 39°.8 and on June 5, 39°.7.

On June 6, at 11 a. m., when the temperature was very low, the monkey was killed. The autopsy and the histo-pathological examination revealed the presence of typical lesions of yellow fever. The result of this last examination was the following: "Nuclear inclusions in hepatic cells. Necrosis. Congestion" (TORRES).

In order to verify if the hæmolymph of infected mosquitoes contains the yellow fever virus or is free from it we considered better to withdraw that fluid directly from the pericardial chamber, where it flows more abundant, principally inside the dorsal vessel, by adopting the following technique. After having fed on blood, the infected mosquito is etherized and its wings and legs cut off. We stick it then firmely, ventral side downwards, to the glueing face of an adhesive tape, mounted on a piece of cork plate, serving as operating table. The punction of the pericaldial chamber is by its nature a microscopic operation and it is indispensable for its performance to use a binocular microscope giving a magnitication of about 60 diameters (occ. 4, object. $a_3$—ZEISS).

The region to be punctioned, the membranous space between the 4th and 5th tergites (figs. 1 and 2), must be sterilized by cauterizing it with the point of a heated glass stylet. For the punction we use glass tubes, drawn out a few moments before the operation so as to form a micropipette (fig. 3). With carefull handling of this micropipette it is not dificult to reach to the pericardial chamber, what is ascertained by the rising of hyaline fluid in the pipette, immediately after the perforation of the intersclerital membrane. If by an intempestive handling of the pipette the stomach is perforated, instead of a clear fluid, we get blood, easely distinguished by its color. The end of the micropipette, filled with hæmolymph, is introduced under lens control in a cut of the skin of the *rhesus* made by a Gillette blade. We thus make an intradermal inoculation of the fluid, the monkey being inoculated by several micropipettes introduced in various cuts.

EXPERIMENT 3. *M. rhesus* nº. 501. Temperature 39°.1. Inoculated on July 20 with the hæmolymph of 8 mosquitoes previously fed on blood of 3 infected monkeys. On the 4 following days the temperature remained nor-

mal. On July 25 it had risen to 40o.3. On the next day, 40o.7. On July 27, 37o in the morning. The monkey died at noon of this day. The histo-pathological examination of the liver made by Dr. TORRES showed typical lesions of yellow fever.

We also tried to prove the infective action of the mosquitoes used in this experiment by inoculating the *rhesus* no. 502 with an emulsion of their bodies. This monkey showed the rise of fever on July 24 and 25, the temperature falling the next day to 38o.9. On the 27th we found it dead. The histo-pathological examination of the liver also revealed typical lesions of yellow fever.

Typ. do Instituto Oswaldo Cruz — Rio de Janeiro — Brasil.